

Aus dem Klinikum der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Arnold
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

**Identifizierung und Charakterisierung von
neuen zytoplasmatischen Interaktionspartnern
des IGF-1 Rezeptors**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

von
Tanja Ligensa
aus Leverkusen

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am

28. Januar 2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referentin: PD Dr. G. Jaques

Koreferent: Prof. Dr. Eilers

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	1
Abkürzungen.....	3
Einleitung	5
1. Das IGF-1-Signaltransduktionssystem.....	5
1.1. Der IGF-1 Rezeptor.....	5
1.2. Die Liganden des IGF-1 Rezeptors	7
1.3. Die IGF-Bindeproteine.....	7
1.4. Die Signaltransduktionskaskaden des IGF-1 Rezeptors	8
1.5. Die zellulären Funktionen des IGF-1 Rezeptors	11
1.5.1. Mitogenität	11
1.5.2. Apoptoseschutz.....	12
1.5.3. Transformation.....	12
1.5.4. Migration.....	13
1.6. Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Vermittlung der spezifischen biologischen Funktionen des IGF-1 Rezeptors	14
1.7. Der IGF-1 Rezeptor und Tumorigenese.....	14
1.7.1. Expression von Komponenten des IGF-1-Systems in humanen Tumoren.....	14
1.7.2. Mögliche therapeutische Ansätze zur Inhibierung des IGF-1 Rezeptor-Signaltransduktionssystems ..	15
2. Das 2-Hybrid-System.....	17
2.1. Das Prinzip des 2-Hybrid-Systems	17
2.2. Anwendung des 2-Hybrid-Systems für die Suche nach Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors	19
2.3. Vorteile und Grenzen des 2-Hybrid-Systems	20
2.4. Varianten des 2-Hybrid-Systems	22
2.5. Das 2-Hybrid System in der Post-Genom-Ära	23
3. Aufgabenstellung.....	25
Material und Methoden.....	26
1. Material.....	26
1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien.....	26
1.2. Standardpuffer.....	26
1.3. Geräte.....	26
1.4. ‘Kits‘ und fertige Lösungen	27
1.5. Oligonukleotide.....	27
1.6. Plasmide und cDNS-Bibliotheken	28
1.7. Antikörper.....	29
1.8. Bakterienstämme.....	30
1.9. Bakterienmedien.....	30
1.10. Hefestämme	30
1.11. Hefemedien.....	31
1.11.1. ‘10xAminosäure-Dropout-Lösungen‘	31
1.11.2. Medien	31
1.12. Zellen und Zelllinien	31
1.13. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	32

2.	Methoden.....	33
2.1.	Molekularbiologische Methoden	33
2.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.1.2.	RT-PCR.....	33
2.1.3.	Sequenzierung	33
2.1.4.	Isolierung von Gesamt-RNS.....	33
2.1.5.	Northern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden.....	33
2.1.6.	Southern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden.....	34
2.2.	Proteinchemische Methoden	34
2.2.1.	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in Bakterien.....	34
2.2.2.	Gesamtproteinextraktion aus Zellen.....	34
2.2.3.	Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten	35
2.2.4.	Herstellung und Aufreinigung eines Antiserums	35
2.2.5.	Immunoblot-Analyse.....	35
2.2.6.	Ko-Immunpräzipitation aus Zelllysaten	36
2.2.7.	‘GST-Pulldown-Assay‘	36
2.3.	Hefe-2-Hybrid-System.....	36
2.3.1.	Untersuchung definierter Interaktionen im 2-Hybrid-System	37
2.3.2.	‘2-Hybrid-Screening‘ von cDNS-Bibliotheken.....	37
2.3.3.	PCR auf Hefekolonien	38
2.3.4.	Sequenzierung von Hefe-PCR-Produkten.....	38
2.3.5.	Präparation von Plasmid-DNS aus Hefen	38
2.3.6.	‘ β -Galaktosidase-Assay‘	39
2.3.7.	Hefekolonieblot.....	39
2.4.	Zellbiologische Methoden	40
2.4.1.	Zellkulturführung	40
2.4.2.	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels FuGene.....	40
2.4.3.	Herstellung stabil transfizierter MCF-7-tet-on-Klone.....	40
2.4.4.	Immunfluoreszenz-Analysen.....	40
2.4.5.	Proliferationstest.....	41
2.4.6.	Transwell-Migrationstest.....	41
Ergebnisse	42
1.	Isolierung von Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor mittels ‘2-Hybrid-Screening‘ von cDNS-Bibliotheken	42
1.1.	Etablierung des 2-Hybrid-Systems für den IGF-1 Rezeptor.....	42
1.1.1.	Konstruktion der IGF-1 Rezeptor-Köder-Vektoren	42
1.1.2.	Evaluierung der Köder-Vektoren BTM116-I1, -I2, -K1 und -K2	43
1.2.	‘Screening‘ von 2-Hybrid-cDNS-Bibliotheken nach IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteinen.....	45
1.2.1.	Die im ‘2-Hybrid-Screening‘ isolierten bekannten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors	47
1.2.2.	Die im ‘2-Hybrid-Screening‘ isolierten neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors	48
1.2.3.	Charakterisierung der Bindungsspezifität der neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors.....	51
1.2.4.	Weitergehende Charakterisierung der Bindungsspezifität von IIP-1.....	52
2.	Klonierung von IIP-1	53
2.1.	Klonierung von IIP-1 und einer Spleißvariante (IIP-1/p26) mittels RT-PCR.....	54
2.2.	Interaktion der Spleißvariante IIP-1/p26 mit dem IGF-1 Rezeptor.....	56
3.	Charakterisierung der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor im 2-Hybrid-System.....	56
3.1.	Identifizierung der PDZ-Domäne von IIP-1 als Bindedomäne für den IGF-1 Rezeptor.....	56

3.1.1.	Klonierung der IIP-1-Deletionsmutanten.....	57
3.1.2.	Interaktion zwischen IIP-1-Deletionsmutanten und IGF-1 Rezeptor in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’	57
3.2.	Identifizierung des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1.....	58
3.2.1.	Klonierung von IGF-1 Rezeptor-Peptiden in den Köder-Vektor BTM116.....	58
3.2.2.	Interaktion von IGF-1 Rezeptor-Peptiden mit IIP-1 in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’	59
4.	Nachweis der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor <i>in vitro</i> und in Säugetierzellen	60
4.1.	Klonierung von IIP-1 in bakterielle und eukaryotische Expressionsvektoren.....	60
4.2.	Interaktion zwischen gereinigtem IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in einem ‘GST-Pulldown-Assay’..	60
4.3.	Ko-Immunpräzipitation von IIP-1-IGF-1 Rezeptor-Komplexen aus Säugetierzellen.....	61
5.	Expressionsstudien zu IIP-1.....	63
5.1.	Expressionsstudien auf mRNA-Ebene.....	63
5.2.	Expressionsstudien auf Protein-Ebene.....	64
5.2.1.	Gewinnung eines polyklonalen anti-IIP-1-Antiserums	64
5.2.2.	Nachweis der Ko-Expression von IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in humanen Tumorzelllinien und Normalzellen	65
5.2.3.	Ko-Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in MCF-7 Zellen	66
6.	Zellbiologische Untersuchungen zu IIP-1	68
6.1.	Tetracyclin-induzierbare Expression von IIP-1 in MCF-7 Zellen	69
6.1.1.	Klonierung von IIP-1 in den eukaryotischen Expressionsvektor pTre	69
6.1.2.	Stabile Transfektion von pTreflag-IIP-1 in MCF-7 Zellen	69
6.2.	Untersuchungen zur IGF-1-abhängigen Proliferation.....	70
6.3.	Untersuchungen zur Motilität von MCF-7 Zellen	71
6.4.	Untersuchungen zur IGF-1-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinasen.....	72
7.	IIP-10.....	73
7.1.	Klonierung von IIP-10.....	73
7.2.	Lokalisation von IIP-10 in IGF-1 Rezeptor-überexprimierenden NIH3T3 Zellen	74
Diskussion	76
1.	Identifizierung von Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors in ‘2-Hybrid-Screens’	76
1.1.	Qualitative Aspekte der ‘2-Hybrid-Screens’	76
1.2.	Bekannte Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors	77
1.3.	Neue Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors	78
2.	IIP-1 als spezifischer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors im 2-Hybrid-System.....	80
2.1.	Die Bedeutung der PDZ-Domäne als Bindedomäne für den IGF-1 Rezeptor.....	80
2.2.	Die Bedeutung des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1	81
3.	IIP-1 als spezifischer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors in Säugetierzellen.....	82
3.1.	Interaktion zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in Säugetierzellen	82
3.2.	Ko-Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor.....	83
3.3.	Einfluß von IIP-1 auf IGF-1-regulierte Zellfunktionen	83
3.4.	Entwicklung eines Modells für die Funktion von IIP-1 in Bezug auf Migrationsprozesse von Zellen.	84
4.	Ausblick.....	88
Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	92
Anhang	104

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Modell des IGF-1 Rezeptors	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionspartner und Signaltransduktionskaskaden des IGF-1 Rezeptors.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des 2-Hybrid-Systems	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus LexA-Bindungsdomäne und der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors	19
Abbildung 5: Varianten des 2-Hybrid-Systems.....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen ‘Linkerregionen‘ zwischen LexA- und IGF-1 Rezeptor-Domäne in dem Köder-Vektor BTM116.....	43
Abbildung 7: Evaluierung der IGF-1 Rezeptor-Köder-Vektoren	44
Abbildung 8: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Verifizierung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und bekannten Bindungspartnern, die in ‘2-Hybrid Screens‘ isoliert wurden.....	47
Abbildung 9: Schematische Darstellung der im ‘2-Hybrid-Screen‘ isolierten cDNS-Klone, die für bekannte IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine kodieren.....	48
Abbildung 10: Schematische Darstellung der in ‘2-Hybrid-Screens‘ isolierten cDNS-Klone, die für neue IGF-1 Rezeptor-interagierende Protein kodieren.....	50
Abbildung 11: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Verifizierung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und in ‘2-Hybrid Screens‘ isolierten neuen Bindungspartnern.....	51
Abbildung 12: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Untersuchung der Interaktion zwischen Insulin Rezeptor und den neuen in ‘2-Hybrid-Screens‘ isolierten IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteinen (IIPs).....	52
Abbildung 13: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1 und verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	53
Abbildung 14: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Untersuchung der Bindungsspezifität von Rezeptor-Tyrosinkinase-bindenden PDZ-Proteinen.	53
Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Reaktion, durch die die ‘volle-Länge-cDNS‘ von IIP-1 generiert wurde.....	54
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IIP-1 und IIP-1/p26.....	55
Abbildung 17: PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-1.....	55
Abbildung 18: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1/p26 und dem IGF-1 Rezeptor.	56
Abbildung 19: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und Deletionsmutanten von IIP-1.....	57
Abbildung 20: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay‘ bzw. ‘ β -Galaktosidase-Assay‘ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1 und C-terminalen IGF-1 Rezeptor-Peptiden.....	59
Abbildung 21: ‘GST-Pulldown-Assay‘ zum Nachweis der Interaktion zwischen gereinigtem IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in vitro..	61
Abbildung 22: Ko-Immunpräzipitationsexperimente zum Nachweis der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in HEK 293 Zellen	62
Abbildung 23: ‘Multiple Tissue Northern Blot‘ zur Untersuchung der IIP-1 Expression in normalen humanen Geweben.....	63
Abbildung 24: ‘Multiple Tissue Expression Array‘ zum Nachweis der IIP-1 Expression in humanen Geweben.....	64
Abbildung 25: Evaluierung des anti-IIP-1-Antiserums in Immunoblot-Experimenten.....	65
Abbildung 26: Immunoblot-Analyse von Krebszelllinien und normalen Zellen zur Untersuchung der Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor.....	66

Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung von flag-IIP-1-überexprimierenden MCF-7-Zellen zur Evaluierung der Spezifität des anti-IIP-1-Antiserums.....	67
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7 Zellen zum Nachweis der Ko-Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor.....	68
Abbildung 29: Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Expression von flag-IIP-1 in MCF-7-Transfektanten..	70
Abbildung 30: Analyse des IGF-1-abhängigen Proliferationsverhalten von MCF-7/IIP-1-Transfektanten.....	71
Abbildung 31: Analyse der Migration von MCF-7/IIP-1-Transfektanten.....	72
Abbildung 32: Immunoblot-Analyse IGF-1-stimulierter MCF-7/IIP-1 Transfektanten zur Untersuchung des Einflusses von IIP-1 auf die ERK-Aktivierung.....	73
Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung von I24 Zellen zur Untersuchung der Lokalisation von IIP-10..	74
Abbildung 34: PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-10.....	75
Abbildung 35: Modell zur Funktion von IIP-1 als direkter Inhibitor der MAP-Kinase bzw. als Kompetitor anderer Signalproteine des IGF-1 Rezeptors.....	86
Abbildung 36: Modell zur Funktion von IIP-1 als 'Brückenprotein' in Signalkomplexen aus $G_{\alpha i}$ und IGF-1 Rezeptor	87
Abbildung 37: Modell zur Darstellung von Syndecan-4, Semcap-1 und Neuropilin-1 als Interaktionspartner von IIP-1.....	88
 Tabelle 1: Auflistung der IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner, die im '2-Hybrid-Screening' einer Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek isoliert wurden.....	46
Tabelle 2: Auflistung der IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner, die im '2-Hybrid-Screening' einer Jurkat-cDNS-Bibliothek isoliert wurden.....	47
Tabelle 3: Auflistung der IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) -Insulin Rezeptor (IR) -Peptide und der entsprechenden Oligonukleotide, die in den Köder-Vektor BTM116 kloniert wurden.....	58

Abkürzungen

AC	‘Accession number‘
AD	Aktivierungsdomäne
3-AT	3-Aminotriazol
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNS	komplementäre DNS
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMEM	‘Dulbecco’s Modified Eagle Medium‘
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	‘Epidermal growth factor‘
ELISA	‘Enzyme linked immunosorbent assay‘
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	‘Expressed sequence tag‘
et. al.	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	‘Focal adhesion kinase‘
FGF	‘Fibroblast growth factor‘
FKS	Fötales Kälberserum
5-FOA	5-Fluor-Orotsäure
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GAIP	‘Gα-interacting protein‘
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GIPC	‘GAIP interacting protein, C-Terminus‘
Grb	‘Growth factor receptor bound protein‘
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N‘-[2-ethansulfonsäure])
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IGF	‘Insulin-like growth factor-1‘
IGF-1R	‘Insulin-like growth factor-1‘ Rezeptor
IGFBP	‘Insulin-like growth factor-1‘-Bindeproteine
IIP	IGF-1 Rezeptor-interagierendes Protein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
IR	Insulin Rezeptor
IRS	‘Insulin related substrate‘
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
-L	Leucin-frei
l	Liter
M	Molar
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
μF	Mikrofarad
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNS	‘messenger’-RNS
MTE	‘Multiple tissue expression array’
MTN	‘Multiple tissue northern blot’
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mu	mutiert
MUPP-1	‘Multiple PDZ domain containing protein-1’
NHERF	‘Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor’
NK	Negativkontrolle
nm	nanometer
NSCLC	‘Non small cell lung cancer’
OD	Optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	‘open reading frame’
P/C/I	Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	‘Platelet derived growth factor’
PDK	‘3-Phosphoinositid-dependent kinase’
PDZ	PSD-95 (postsynaptic density protein-95), Disc large, ZO-1 (zonula occludens-1)
PEG	Polyethylenglykol
PH	‘Pleckstrin Homology’
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PK	Positivkontrolle
pmol	picomol
POD	Peroxidase
PS	Präimmunserum
PTB	‘Phosphotyrosine binding’
PY	Phosphotyrosin
RGS	‘Regulator of G-Protein signaling’
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Semcap-1	‘SemF cytoplasmic domain associated protein’
SH2	‘Src homology-2’
SH3	‘Src homology-3’
SRS	‘Sos recruitment system’
STAT	‘Signaltransducer and activator of transcription’
Sv	Sievert
-T	Tryptophan-frei
-THULL	Tryptophan-, Histidin-, Uracil-, Leucin-, Lysin-frei
-TL	Tryptophan-, Leucin-frei
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	‘Unit’
UAS	‘Upstream activating sequence’
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
wt	Wildtyp
WT-1	Willm’s Tumor-1
z.B.	zum Beispiel
zp	zytoplasmatisch

Einleitung

1. Das IGF-1-Signaltransduktionssystem

Die Kommunikation zwischen Zellen ist essentiell für die Entwicklung und das Überleben multizellulärer Organismen. Eine große Anzahl von zellulären Signalen, die durch sezernierte Polypeptide und ihre Zelloberflächen-Rezeptoren induziert werden, regulieren Wachstum, Differenzierung und metabolische Homöostase. Viele Wachstumsfaktoren und Zytokine und ihre Zelloberflächen-Rezeptoren spielen dabei eine zentrale Rolle. Zu diesen Zelloberflächen-Rezeptoren gehört die große Familie der Rezeptoren, die sich durch eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität auszeichnen (Rezeptor-Tyrosinkinasen).

Der Rezeptor für den 'Insulin-like growth factor-1' (IGF-1) zählt zu dieser Familie. Seine Liganden IGF-1 und IGF-2 spielen durch ihre mitogenen, anti-apoptotischen und chemotaktischen Eigenschaften nicht nur eine wichtige Rolle in Entwicklungs- und Wachstumsprozessen von normalen Zellen sondern auch während der Entstehung und Progression von Tumoren. Aufgrund seiner tumorigenen Eigenschaften wird der IGF-1 Rezeptor in der onkologischen Forschung durchaus als Zielmolekül ('Target') für therapeutische Ansätze diskutiert.

1.1. Der IGF-1 Rezeptor

Der IGF-1 Rezeptor wurde von Ullrich et. al. erstmals isoliert (Ullrich et al., 1986) und gehört unter den Rezeptor-Tyrosinkinasen zu der Unterfamilie des Insulin Rezeptors, zu der neben dem IGF-1 Rezeptor und dem Insulin Rezeptor der 'Insulin-related Rezeptor', ROS und Ltk zählen. Der IGF-1 Rezeptor, der zu 70 % homolog zum Insulin Rezeptor ist, besteht aus einem durch Disulfidbrücken verbundenen Heterotetramer aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten (Abbildung 1). Die α -Untereinheit ist in ihrer Gesamtheit extrazellulär. Eine cysteinreiche Region vermittelt die Bindung der Liganden IGF-1, IGF-2 und Insulin. Die β -Untereinheit zeichnet sich durch einen extrazellulären Anteil, der mit einer α -Untereinheit durch eine Disulfidbrücke verbunden ist, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne aus. Die intrazelluläre Domäne kann als Effektor-Domäne bezeichnet werden, da sie die Weiterleitung von Signalen in die Zelle vermittelt. Sie besteht aus drei Regionen, einer juxtamembranen Domäne, der zentralen Tyrosinkinase-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Interessanterweise unterscheiden sich die einzelnen Regionen der β -Untereinheit in ihrer Homologie zum Insulin Rezeptor. Während die Tyrosinkinase-Domäne mit einer Homologie von 84 % die größte Ähnlichkeit zu der des Insulin Rezeptors aufweist und die juxtamembrane Domäne mit einer 61 prozentigen Homologie auch noch eine hohe Identität zu der des Insulin Rezeptors zeigt, ist die C-terminale Domäne mit einer Homologie von 44 % am wenigsten verwandt mit der des Insulin Rezeptors (Baserga et al., 1997).

Die intrinsische Tyrosinkinase des Rezeptors ist in Abwesenheit von Liganden nicht aktiv. Erst durch Ligandenbindung an die α -Untereinheit wird die Tyrosinkinase-Aktivität der β -Untereinheit stimuliert, wodurch zunächst eine Kreuz-Autophosphorylierung des in der Kinase-Domäne liegenden 'Tyrosin-Clusters' (Y1131, Y1135, Y1136) induziert wird. Die Phosphorylierung dieses 'Tyrosin-Clusters' scheint eine Voraussetzung für eine volle Aktivierung der Tyrosinkinase zu sein. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß sowohl eine Mutation des Lysins an Position 1033 in der ATP-

Bindungsstelle zu einem Alanin als auch ein Austausch der Tyrosine an Position 1131, 1135 und 1136 gegen Phenylalanine zu einem Verlust der Enzymaktivität und aller biologischen Aktivitäten des Rezeptors führt (Kato et al., 1994; Kato et al., 1993).

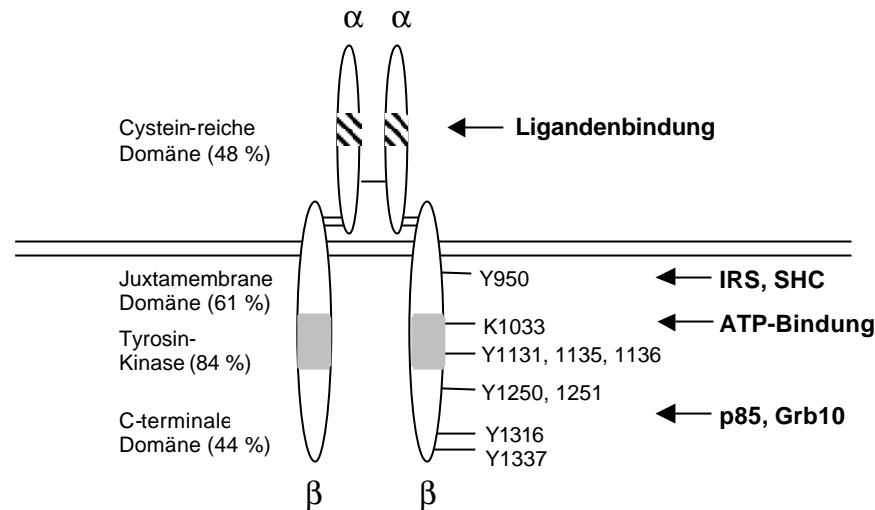


Abbildung 1: Modell des IGF-1 Rezeptors. Die Domänen der α - und β -Untereinheit und wichtige Aminosäurereste sind eingezeichnet. In Klammern sind die Identitäten der einzelnen Domänen mit dem Insulin Rezeptor angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Bindungsstellen für wichtige Signalmoleküle des IGF-1 Rezeptors.

Die Phosphorylierung des 'Tyrosin-Clusters' ist jedoch nur der erste Schritt in der Phosphorylierungskaskade des Rezeptors. Es schließen sich weitere Phosphorylierungsereignisse von Tyrosinresten in der β -Untereinheit an, die als Bindungsstellen für zytoplasmatische Signalproteine fungieren können. Außerdem ist die aktivierte Tyrosinkinase des Rezeptors auch für eine Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen verantwortlich. Durch beide Ereignisse werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die die zellulären Effekte des IGF-1 Rezeptors vermitteln.

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten sowohl im juxtamembranen als auch im C-terminalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne ist für die Vermittlung der Rezeptorfunktionen essentiell. Beispielsweise trägt der Tyrosinrest an Position 950 zu dem mitogenen und transformierenden Potential des IGF-1 Rezeptors bei (Miura et al., 1995). Dieser Tyrosinrest liegt in einem NPXY-Motiv, das auch an vergleichbarer Position im Insulin Rezeptor und in anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen zu finden ist, und fungiert nach seiner Phosphorylierung u.a. als Bindungsstelle für IRS-1 und SHC (Tartare-Deckert et al., 1995). Neben der Bedeutung in der Signaltransduktion des Rezeptors ist das NPXY-Motiv jedoch auch an der 'coated-pit'-vermittelten Internalisierung von IGF-1 beteiligt (Hsu et al., 1994). Doch nicht nur die juxtamembrane Domäne ist für die Weiterleitung IGF-1-induzierter Signale wichtig, sondern auch der C-Terminus und in diesem besonders die Tyrosinreste an Position 1250, 1251 und 1316. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß diese Tyrosinreste tumorigene Effekte des Rezeptors vermitteln (Blakesley et al., 1996). Die C-terminalen Phosphotyrosin-Reste stellen natürlich ebenfalls Bindestellen für intrazelluläre Signalproteine dar. So bindet die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase, p85, an den phosphorylierten Tyrosinrest an Position 1316 (Seely et al., 1995) und auch das Adaptorprotein Grb10 interagiert mit C-terminalen Tyrosinresten (Dey et al., 1996).

1.2. Die Liganden des IGF-1 Rezeptors

Die Hauptliganden des IGF-1 Rezeptors sind IGF-1 und IGF-2. Beides sind Polypeptide aus einer einzigen Aminosäurekette (Werner et al., 1994). Die beiden Moleküle zeigen eine 62 prozentige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz, und ihre Struktur ähnelt der von Proinsulin. Sie werden von fast allen Geweben exprimiert und binden an eine cysteinreiche Region in der α -Untereinheit des Rezeptors mit etwa gleicher Affinität (10^{-10} M), während Insulin eine 500 bis 1000 fach geringere Bindungsaffinität für den IGF-1 Rezeptor aufweist (Jones und Clemmons, 1995). IGF-1 spielt als Wachstumsfaktor sowohl auf autokrinem als auch auf parakrinem und endokrinem Weg eine Rolle. Die Gewebeverfügbarkeit von IGF-1 wird einerseits über lokale Mechanismen wie über eine Kontrolle der Expression von IGF-1 und seiner Bindeproteine und andererseits über systemische Mechanismen reguliert. In diesem Zusammenhang spielt das Wachstumshormon ('growth hormone') GH eine wichtige Rolle. GH induziert die Expression von IGF-1 in der Leber, der Hauptquelle für zirkulierendes IGF-1 (erstmalig identifiziert als 'Somatomedin'=Vermittler der Wirkung von GH (Salmon und Maughday, 1957)) und kontrolliert über diesen Mechanismus Wachstum und Entwicklung von Organismen. Jüngste Befunde widersprechen jedoch dieser 'Somatomedin-Hypothese'. Es konnte nämlich über ein gezieltes Ausschalten ('Knock out') des IGF-1-Gens in hepatischen Geweben gezeigt werden, daß die autokrine/parakrine Wirkung von IGF-1 für normales Wachstum und eine normale Entwicklung ausreicht und die endokrine Wirkung über vornehmlich in der Leber synthetisiertes IGF-1 für diese Prozesse von geringerer Bedeutung ist (Yakar et al., 1999). Für IGF-2 existiert ein eigener Rezeptor, der auch als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bekannt ist (Morgan et al., 1987). Der IGF-2 Rezeptor zählt jedoch nicht zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Da die Bindung von IGF-2 an diesen Rezeptor zu einer Degradation von IGF-2 führt, scheint der IGF-2 Rezeptor eine Rolle als Antagonist für IGF-2 zu spielen und die biologische Aktivität von IGF-2, die vornehmlich über den IGF-1 Rezeptor vermittelt wird, zu regulieren (Oates et al., 1998).

1.3. Die IGF-Bindeproteine

Zu der Familie der IGF-Bindeproteine (IGFBPs) zählen sechs gut charakterisierte Mitglieder (IGFBP-1 bis 6), die als Transportproteine für die IGFs deren Funktion modulieren können. Neben diesen IGF-abhängigen Funktionen zeichnen sich die IGFBPs aber auch durch IGF-unabhängige Funktionen wie die Bindung an Membran-Rezeptoren oder die extrazelluläre Matrix aus (Yu und Rohan, 2000).

IGFBPs sind in der Lage, die Wirkung der IGFs zu inhibieren aber auch zu verstärken. Diese sich widersprechenden Effekte können durch zwei wichtige Funktionen der IGFBPs erklärt werden. Einerseits weisen IGFBPs eine höhere Bindungsaffinität für IGF-1 und IGF-2 auf als der Rezeptor selbst, wodurch die Bindung von IGFs an ihren Rezeptor verhindert und so die Vermittlung IGF-abhängiger Effekte inhibiert wird. Andererseits können jedoch IGF-1 und IGF-2 durch die Interaktion mit den Bindeproteinen vor proteolytischem Abbau geschützt werden, was wiederum in einer erhöhten lokalen Verfügbarkeit an IGFs und damit einer Verstärkung IGF-abhängiger Effekte resultiert (Kelley et al., 1996).

Das komplexe System aus IGFs, den Rezeptoren und Bindeproteinen wird durch die Existenz IGFBP-spezifischer Proteasen erweitert, die regulatorisch in das Zusammenspiel aus IGFs und IGFBPs durch proteolytische Degradation von IGFBPs eingreifen (Collett-Solberg und Cohen, 1996). Der Prostata-Tumormarker PSA ('prostate specific antigen') zählt zu diesen Proteasen. PSA ist eine Serin-Protease,

die IGFBP-3 spaltet. Durch die Proteolyse von IGFBP-3 wird dessen Affinität für IGF-1 vermindert, wodurch im folgenden IGF-1 frei verfügbar wird und durch Bindung an seinen Rezeptor mitogene Effekte induzieren kann (Cohen et al., 1994).

1.4. Die Signaltransduktionskaskaden des IGF-1 Rezeptors

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne der β -Untereinheit des IGF-1 Rezeptors resultiert in der Ausbildung von hochaffinen Bindungsmotiven für Signalproteine. Zwei Protein-Interaktionsdomänen sind bislang beschrieben worden, die an Phosphotyrosin-haltige Motive binden, die 'Src-Homologie-Domäne-2' (SH2) und die 'Phosphotyrosin-Bindungsdomäne' (PTB) (Pawson und Scott, 1997). Eine reversible Phosphorylierung dieser Tyrosinreste kann damit als eine Art 'molekularer Schalter' fungieren, um die Assoziation von Multiprotein-Komplexen zu induzieren.

Neben diesen Phosphotyrosin-abhängigen Interaktionsdomänen spielen bei der Signalweiterleitung jedoch auch Proteindomänen, die phosphorylierungsunabhängig mit ihrem Bindungspartner interagieren, eine wichtige Rolle. Dazu zählen die 'Src-Homologie-Domäne-3' (SH3), die an Prolin-reiche Motive bindet (Pawson und Scott, 1997), und die 'Pleckstrin-Homologie-Domäne' (PH), die sowohl Protein-Protein- als auch Protein-Lipid-Interaktionen vermittelt (Lemmon et al., 1996).

Eine bislang im Zusammenhang mit Rezeptor-Tyrosinkinasen wenig diskutierte Protein-Interaktionsdomäne ist die PDZ-Domäne, die nach den ersten Proteinen, in denen diese Domäne entdeckt wurde (postsynaptic density protein-95, disc large, zonula occludens-1), benannt wurde und mit dem C-Terminus ihrer Bindungspartner interagiert (Ponting et al., 1997). Mehrere PDZ-Proteine wurden mittlerweile jedoch als Interaktionspartner für Rezeptor-Tyrosinkinasen isoliert (Fanning und Anderson, 1999).

Die Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

Bislang sind eine Reihe von direkten zytoplasmatischen Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor bekannt (Abbildung 2). Zu diesen zählen die Insulin-Rezeptor-Substrate 1-4 und SHC, die über ihre PTB-Domäne mit dem NPEY-Motiv in der juxtamembranen Domäne der β -Untereinheit interagieren (Dey et al., 1996; He et al., 1996; He et al., 1995; Qu et al., 1999; Xu et al., 1999). Aber auch sehr viele SH2-Proteine wie das GTPase-aktivierende Protein GAP, die p85-Untereinheit der PI3-Kinase, die Tyrosinphosphatase PTP1D (Syp) und die Adaptorproteine Grb10 und mSH2B binden an den IGF-1 Rezeptor (Lamothe et al., 1995; Morriane et al., 1996; Seely et al., 1995; Wang und Riedel, 1998). All diese SH2-Proteine interagieren mit C-terminalen Phosphotyrosin-Resten des IGF-1 Rezeptors. Auch 14-3-3 Proteine, die an Phosphoserin-Reste ihrer Interaktionspartner binden, wurden als Interaktionspartner der C-terminalen Region des IGF-1 Rezeptors beschrieben (Furlanetto et al., 1997). Interessanterweise wird der IGF-1 Rezeptor sogar über eine Interaktion mit den Janus-Kinasen JAK-1 und JAK-2 sowie mit einem Inhibitor des STAT-Signaltransduktionsweges, SOCS-3, an Zytokin-induzierte Signaltransduktionskaskaden gekoppelt (Dey et al., 2000; Gual et al., 1998).

Die oben aufgeführten Signalproteine sind jedoch nicht spezifisch für den IGF-1 Rezeptor, sondern fungieren für andere Rezeptor-Tyrosinkinasen ebenfalls als Interaktionspartner (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Bis auf 14-3-3 Proteine interagieren sie alle mit dem Insulin Rezeptor und sind an der Weiterleitung Insulin-induzierter Signale in die Zelle beteiligt (Blakesley et al., 1996; Kadowaki et al., 1996). Vor allem die Insulin-Rezeptor-Substrate spielen als Effektormoleküle in Insulin-abhängigen Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle (Waters und Pessin, 1996).

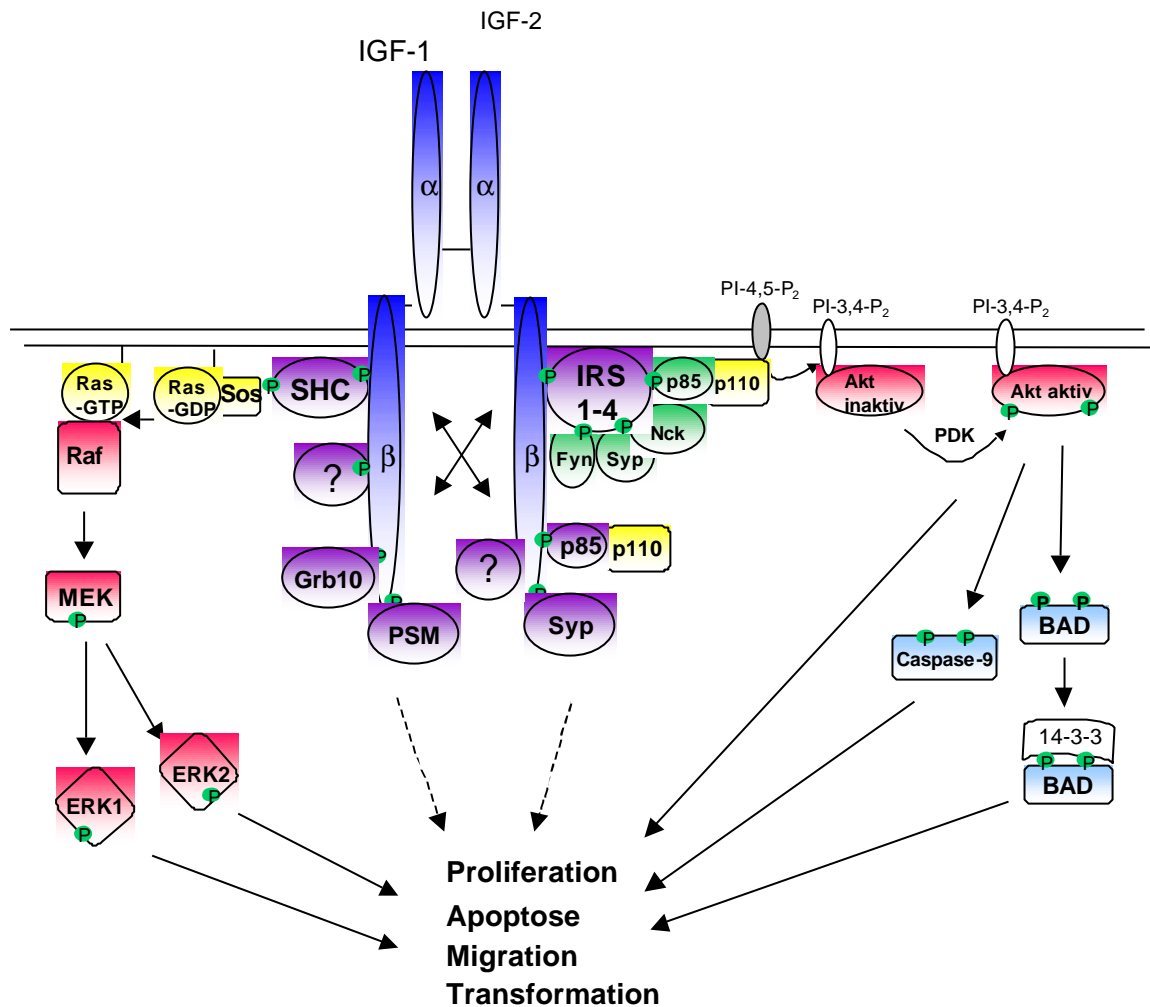


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionspartner und Signaltransduktionskaskaden des IGF-1 Rezeptors. ZM, Zellmembran; P, Phospho-Tyrosin oder -Serin/Threonin-Reste; PDK, '3-Phosphoinositid-dependent kinase'; PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne; KD, Kinase-Domäne; RD, Regulatorische Domäne. Gestrichelte Pfeile stellen noch nicht geklärte Signalwege dar. ? deuten auf potentielle neue Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors hin, die für die spezifischen zellulären Effekte des IGF-1 Rezeptors verantwortlich sein könnten.

Auf welche Weise tragen nun die beschriebenen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors zu der Weiterleitung IGF-1-spezifischer Signale und zu der Induktion IGF-1-abhängiger zellulärer Effekte bei?

Der klassische Weg der Aktivierung von durch Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelten Signaltransduktionswegen erfolgt im allgemeinen – nach einer Rekrutierung der Interaktionspartner an den aktivierten Rezeptor – über die Phosphorylierung dieser Bindungspartner an Tyrosinresten. Dadurch entstehen Bindungsstellen für weitere Signalproteine, die dann über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zelluläre Effekte auslösen können. Auch die Weiterleitung IGF-1-induzierter Signale verläuft nach diesem Prinzip, wobei die wichtigsten Elemente der IGF-1-abhängigen Kaskaden, wie oben erwähnt, redundant sind, d.h. auch an den Signalwegen anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen beteiligt sind.

Die bislang am besten charakterisierten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors sind die IRS- und SHC-Proteine, die eine Reihe von Tyrosinresten beinhalten, die nach Phosphorylierung durch den IGF-1 Rezeptor als Bindungsstellen für weitere Signalproteine fungieren. IRS-Proteine interagieren

beispielsweise mit den Adaptorproteinen Grb2 und nck und der p85-Untereinheit der PI-3-Kinase. Ein wichtiger Bindungspartner für SHC ist ebenfalls Grb2. Ein weiterer gut beschriebener Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors ist die p85-Untereinheit der PI-3-Kinase, obwohl bislang nicht geklärt ist, ob dieses Signalprotein seine Funktion vornehmlich über direkte Bindung an den IGF-1 Rezeptor ausübt oder in größerem Ausmaß über die Bindung an IRS-Proteine (Butler et al., 1998). Über die funktionelle Bedeutung der übrigen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors ist bislang wenig bekannt. Viele fungieren jedoch auch als Adaptorproteine für weitere Signalmoleküle. Besonders wichtige Signalwege für die Vermittlung IGF-1-abhängiger Effekte sind der MAP-Kinase- und der Akt-Signalweg (Abbildung 2).

Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges durch IGF-1

Vor allem die IRS- und SHC-Proteine sind an der IGF-1-abhängigen Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges beteiligt, da sie Bindungsstellen für das Adaptorprotein Grb2 aufweisen. Eine IGF-1 Rezeptor-Aktivierung resultiert zunächst in einer Rekrutierung von IRS/SHC-Proteinen an den IGF-1 Rezeptor. Im folgenden kommt es zu einer Phosphorylierung dieser Signalproteine an Tyrosinresten. Diese können dann als Bindungsstellen für die SH2-Domäne von Grb2 fungieren. Daraufhin wird das GEF (guanine nucleotide exchange factor)-Protein Sos, das über seine SH3-Domäne an Grb2 gekoppelt ist, in Membran-Nähe gebracht. Sos katalysiert dort den Austausch von GDP gegen GTP in dem GTP-bindenden Protein Ras. Dies führt zu einer Aktivierung von Ras und des Raf-MAP-Kinase-Signalweges, der beispielsweise an der Regulation von Proliferations- und Apoptoseprozessen beteiligt ist aber auch Migrationsprozesse moduliert (Chang und Karin, 2001; Giancotti und Ruoslahti, 1999).

Aktivierung des PI3-Kinase-Akt-Signaltransduktionsweges durch IGF-1

Die Bindung der p85-Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase direkt an den aktivierten IGF-1 Rezeptor oder an einen Phosphotyrosin-Rest in einem der an den Rezeptor gebundenen IRS-Moleküle resultiert in der Aktivierung der katalytischen Untereinheit dieser Kinase (p110). Auf diese Weise wird der IGF-1 Rezeptor an den Phospholipid-Signalweg gekoppelt, durch den viele zelluläre Prozesse wie Apoptoseschutz, Proliferation, Glukose-Transport und Proteinsynthese reguliert werden (Butler et al., 1998).

Ein elementarer Bestandteil des Phosphoinositid-Signalweges ist die Serin/Threonin-Kinase Akt, die auch als Proteinkinase B bezeichnet wird. Akt ist ein zytoplasmatisches Protein, das über Bindung an durch die aktivierte PI3-Kinase erzeugtes Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat bzw. Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat an die Membran rekrutiert wird. Die Bindung an Phosphoinositole induziert eine Konformationsänderung in Akt, wodurch ein Serin-Rest in der regulatorischen Domäne (Ser-473) und ein Threonin-Rest in der katalytischen Domäne (Thr- 308) für die Serin/Threonin-Kinasen PDK-1 und -2 ('3-phosphoinositid dependent kinase') zugänglich werden. Diese Phosphorylierungsschritte führen zu einer vollen Aktivierung der Akt-Kinase (Datta et al., 1999).

Bislang wurden eine Reihe von Substraten für Akt beschrieben. Die Phosphorylierung vieler dieser Substrate steht in direktem Zusammenhang mit den anti-apoptotischen Effekten von IGF-1. Beispielsweise führt die Phosphorylierung des Apoptose-vermittelnden BAD-Proteins durch die Bindung an 14-3-3 Proteine zu einer Inaktivierung von BAD und damit zu einem Überleben von Zellen (Datta et al., 1997). Ein weiteres Substrat für die Akt-Kinase ist Caspase-9, die durch Serin-Phosphorylierung durch einen bislang nicht bekannten Mechanismus inaktiviert wird. Auf diese Weise

wird der durch Caspase-9 regulierte Apoptose-induzierende Signalweg ebenfalls inhibiert (Cardone et al., 1998). Die Akt-Kinase beeinflusst jedoch nicht nur die vorhandene 'Apoptose-Maschinerie' der Zelle sondern auch eine *de novo* Genexpression z.B. durch die Phosphorylierung der 'Forkhead'-Transkriptionsfaktoren. Dieser Phosphorylierungsschritt ermöglicht eine Bindung der 'Forkhead'-Transkriptionsfaktoren an 14-3-3 Proteine. Dadurch werden diese Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma zurückgehalten, und damit die Transkription durch Forkhead-Faktoren regulierter Gene wie z.B. das für den Apoptose-induzierenden Fas-Liganden kodierende Gen unterbunden (Brunet et al., 1999). Neben diesen Apoptose-inhibierenden Funktionen werden der Akt-Kinase jedoch noch weitere Funktionen zugeordnet wie die Regulation der Glykogensynthese durch Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 GSK-3 (Cross et al., 1995).

1.5. Die zellulären Funktionen des IGF-1 Rezeptors

Aus den obigen Ausführungen über das Signaltransduktionssystem des IGF-1 Rezeptors geht bereits hervor, daß dieser Rezeptor an der Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt ist. Der IGF-1 Rezeptor reguliert so wichtige biologische Funktionen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen.

1.5.1. Mitogenität

Die mitogenen Effekte von IGF-1 sind essentiell für die Wachstumskontrolle von Zellen. Frühe Experimente mit spezifischen anti-IGF-1-Antikörpern haben gezeigt, daß IGF-1 in Zellkulturexperimenten eine essentielle Funktion für die Progression von Zellen durch den Zellzyklus besitzt (Russell et al., 1984). Eine Rolle als Progressionsfaktor kann IGF-1 auch aufgrund der Beobachtung zugesprochen werden, daß Kompetenzfaktoren wie FGF, EGF und PDGF die Expression von IGF-1 Rezeptor und IGF-1 (Hernandez-Sanchez et al., 1997; Li und Baserga, 1996; Rubini et al., 1994) induzieren. Erst wenn der IGF-1 Rezeptor und sein Ligand in ausreichenden Konzentrationen vorliegen, ist eine G1-S-Transition und damit ein Übergang von einem nicht-mitogenen in einen mitogenen Status der Zellen möglich. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Zellen mit weniger als 15 000 IGF-1-Bindungsstellen nicht in serumfreiem Medium unter Zusatz von IGF-1 wachsen können, während Zellen mit 22 000 Bindungsstellen oder stabile Transfektanten, die den IGF-1 Rezeptor überexprimieren, in Anwesenheit von IGF-1 proliferieren (Pietrkowski et al., 1992; Rubini et al., 1997). Balb/c-3T3-Zellen, die sowohl IGF-1 als auch den IGF-1 Rezeptor überexprimieren, wachsen sogar in serumfreiem Medium ohne den Zusatz jeglicher Wachstumsfaktoren (Pietrkowski et al., 1992). Umgekehrt führt eine Inhibition der IGF-1 Rezeptor-Funktion entweder durch selektives Ausschalten des entsprechenden Gens, durch spezifische Antikörper oder durch Antisense-Strategien zu einer Inhibition des Wachstums von Fibroblasten (Pietrkowski et al., 1992; Porcu et al., 1992; Sell et al., 1994).

Auch im Organismus kommt dem IGF-1-System eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation zu. Die Plasma-Konzentrationen von IGF-1 ist ein guter Indikator für das Körperwachstum. Niedrige IGF-1-Plasmaspiegel werden oft bei Kleinwüchsigen gefunden (Baserga et al., 1997). In Tierexperimenten konnte zudem gezeigt werden, daß transgene IGF-1-überexprimierende Mäuse ein verstärktes Körperwachstum aufweisen, während 'Knock-out'-Mäuse mit einer Nullmutation im IGF-1-Gen starke Defizite im Wachstum besitzen (Liu et al., 1993; Mathews et al., 1988).

1.5.2. Apoptoseschutz

Neben seinen proliferativen Eigenschaften besitzt IGF-1 durch seine anti-apoptotischen Eigenschaften eine wichtige Funktion als 'Survival-Faktor' von Tumorzellen.

Eine Reihe von Zellkultur-Experimenten haben die Bedeutung von IGF-1 als potentes anti-apoptotisches Agens bewiesen. IGF-1 schützt hämatopoetische Zellen vor einer durch Interleukin-3-Entzug induzierten Apoptose (McCubrey et al., 1991) und in Fibroblasten verhindert die Anwesenheit von IGF-1 einen durch c-myc-Überexpression induzierten Zelltod (Harrington et al., 1994). Sell et al. konnten außerdem zeigen, daß eine Überexpression des IGF-1 Rezeptors einen Schutz vor durch Etoposid induzierter Apoptose vermitteln kann (Sell et al., 1995). Noch eindeutiger als die zellbiologischen Daten sind die Ergebnisse aus Experimenten mit Tumormodellen. Eine Abnahme der IGF-1 Rezeptor-Anzahl in Tumorzellen unter einen für Zellen normalen Wert oder eine Repression der IGF-1 Rezeptor-Expression resultiert *in vivo* in einer massiven Apoptose von Tumorzellen (Resnicoff et al., 1995; Resnicoff et al., 1995). Daher scheint die kritische Determinante für das Überleben vieler Tumorzellen die Anzahl von IGF-1 Rezeptoren an der Zelloberfläche zu sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, daß in normalen Zellen die IGF-1 Rezeptor-Genexpression durch die pro-apoptotischen Tumor-Suppressoren p53 und WT-1 reprimiert wird (Werner et al., 1996; Werner et al., 1994). In vielen Tumoren ist p53 mutiert, wodurch der IGF-1 Rezeptor-Gen-Promoter de-reprimiert und die IGF-1 Rezeptor-Genexpression aktiviert wird. Eine Überexpression des IGF-1 Rezeptors kann so dazu beitragen, das Überleben von Tumorzellen sicherzustellen.

1.5.3. Transformation

Es gibt eine Reihe von experimentellen Hinweisen, daß der IGF-1 Rezeptor auch an der Etablierung eines transformierten Phänotypes, welcher u.a. durch die Fähigkeit der Koloniebildung in Softagar und/oder Tumorbildung in Nacktmäusen definiert wird, beteiligt ist:

- (1) Maus-Fibroblasten, in denen das IGF-1 Rezeptor-Gen ausgeschaltet ist (R⁻-Zellen), können nicht mehr durch bestimmte zelluläre Onkogene transformiert werden, während normale Maus-Fibroblasten mit einer physiologischen Anzahl von IGF-1 Oberflächenrezeptoren von diesen Onkogenen durchaus transformiert werden. Die Liste der Onkogene, die R⁻-Zellen nicht transformieren können, schließt das 'Large T-Antigen' des SV40-Virus (Sell et al., 1993), aktiviertes ras (Sell et al., 1994), das E5 Protein des bovinen Papilloma-Virus (Morrione et al., 1995) und überexprimierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie den EGF Rezeptor (Coppola et al., 1994) und den PDGFβ Rezeptor (DeAngelis et al., 1995) ein.
- (2) Desweiteren kann ein transformierter Phänotyp durch Reduktion der IGF-1 Rezeptorzahl in einen nicht-transformierten Phänotyp umgewandelt werden. Mit Antisense-Strategien wurde z.B. die IGF-1 Rezeptor-Expression in humanen Lungenkarzinomzellen reprimiert, wodurch die Koloniebildung in 'Softagar-Assays' um 84 % reduziert werden konnte (Lee et al., 1996). Auch eine Inhibition der IGF-1 Rezeptor-Funktion durch spezifische Antikörper oder Expression einer dominant-negativen Mutante führte in Brust- und Ovarialkarzinomzellen zu einer Inhibition der Tumorigenese (Arteaga et al., 1989; Resnicoff et al., 1993).
- (3) Umgekehrt resultiert eine Überexpression des IGF-1 Rezeptors in NIH3T3-Zellen in einem Wachstum in Softagar. Desweiteren führt eine Inokulation dieser Zellen in Nacktmäusen zu einer Tumorbildung (Kaleko et al., 1990).

1.5.4. Migration

IGF-1 ist als ein chemotaktisches Agens für verschiedene Zellen wie Melanomzellen, Pankreas-Karzinomzellen, Brustkrebszellen und Endothelzellen beschrieben worden (Doerr und Jones, 1996; Grant et al., 1987; Klemke et al., 1994; Stracke et al., 1989).

Ein Mechanismus, durch den IGF-1 zelluläre Migration fördert, ist die Regulation von Integrinen, die als heterodimere Transmembranproteine die Interaktion zwischen Zell-Matrix und Zytoskelett kontrollieren. Eine IGF-1-Behandlung von vaskulären glatten Muskelzellen kann beispielsweise die Affinität von $\alpha V\beta 3$ -Integrinen zu seinen Liganden erhöhen (Jones et al., 1996), und in MCF-7 Brustkrebszellen hängt eine IGF-1-stimulierte Migration von der Anwesenheit von $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrinen ab (Doerr und Jones, 1996). Auch in Tumormodellen wurde eine Kooperation von IGF-1 und Integrinen als Voraussetzung für eine Tumorzell-Dissemination beschrieben (Brooks et al., 1997). Desweiteren kann IGF-1 eine Reorganisation des Aktin-Zytosketts induzieren, was ein kritischer Schritt in dem Migrationsprozeß von Zellen ist. Dieser IGF-1-abhängige Effekt wurde z.B. bei dem Auswachsen von Neuriten und der Depolarisation von MCF-7-Brustkrebszellen (Guvakova und Surmacz, 1999; Leventhal et al., 1997) beobachtet. Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß eine Mutation in einem C-terminalen Tyrosinrest (Y1251) im IGF-1 Rezeptor zu einer Disorganisation des Zytosketts führt (Blakesley et al., 1998).

Jedoch nicht nur auf zellbiologischer sondern auch auf biochemischer Ebene wurden Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IGF-1 Rezeptor und der Regulation von Migrationsprozessen gefunden. So gibt es mehrere Befunde, die zeigen, daß Elemente der fokalen Adhäsionsplaques wie die fokale Adhäsionskinase FAK, Cas und Paxillin Substrate für die IGF-1 Rezeptor-Tyrosinkinase sind (Baron et al., 1998; Casamassima und Rozengurt, 1998; Leventhal et al., 1997). Eine Phosphorylierung dieser Proteine führt zu einer stärkeren Komplexierung von fokalen Adhäsionsplaques und damit zu einer stärkeren Interaktion zwischen Integrinen und Elementen des Zytosketts (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Aber auch andere Substrate des IGF-1 Rezeptors wie das Adaptorprotein SHC sind an der Regulation von Migrationsprozessen beteiligt (Giancotti und Ruoslahti, 1999). So reguliert eine Interaktion zwischen SHC und $\alpha_5\beta_1$ -Integrin die IGF-1-induzierte Motilität der Brustkrebszelllinie MCF-7 (Mauro et al., 1999).

Die durch IGF-1 regulierten Signalwege des IGF-1 Rezeptors, der PI3-Kinase und der MAP-Kinase-Signalweg, sind ebenfalls als Elemente der Signaltransduktionskaskaden beschrieben worden, die zu einer verstärkten Migration von Zellen führen (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Eine IGF-1-Stimulation führt z.B. zu einem durch die MAP-Kinase vermittelten Auswachsen von Neuriten (Kim et al., 1997), und die Migration vaskulärer glatter Muskelzellen nach IGF-1-Behandlung ist sowohl von einer Aktivierung des MAP-Kinase- als auch des PI3-Kinase-Signaltransduktionswegs abhängig (Imai und Clemmons, 1999).

Neben den hier dargestellten zellbiologischen Daten weisen auch Befunde aus Tumormodellen auf eine Rolle des IGF-1 Rezeptors in der Regulation von Metastasierungsprozessen hin. H-59-Leberkarzinomzellen verlieren z.B. nach Transfektion mit einem IGF-1 Rezeptor-Antisense-Konstrukt die Fähigkeit *in vivo* zu metastasieren (Long et al., 1995), und MDA-MB-231 Brustkrebszellen zeigen ein wesentlich geringeres Metastasierungspotential nach Expression einer dominant-negativen Mutante des IGF-1 Rezeptors (Dunn et al., 1998).

1.6. Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Vermittlung der spezifischen biologischen Funktionen des IGF-1 Rezeptors

Während der Insulin Rezeptor und der IGF-1 Rezeptor eine sehr ähnliche Gesamtstruktur aufweisen und in ihrer Kinase-Domäne zu 84 % homolog sind, vermittelt der Insulin Rezeptor vornehmlich metabolische Effekte, der IGF-1 Rezeptor jedoch vor allem Wachstumsprozesse von Zellen. Da die C-terminale Region der beiden Rezeptoren die am meisten divergente ist, liegt die Vermutung nahe, daß diese Domäne als Bindungsstelle für potentielle spezifische Interaktionspartner fungiert, die für die Weiterleitung der spezifischen biologischen Effekte der Rezeptoren verantwortlich sind. Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, daß 14-3-3, das bislang einzige Substrat des IGF-1 Rezeptors, das nicht an den Insulin Rezeptor bindet, mit C-terminalen Serin-Resten interagiert (Furlanetto et al., 1997)

Zahlreiche Mutationsanalysen der C-terminalen Domäne des IGF-1 Rezeptors wurden durchgeführt, um die Bedeutung dieser Domäne für die Vermittlung der tumorigenen Eigenschaften des Rezeptors aufzuklären. Interessanterweise zeigen Mutationen in diesem Bereich einen negativen Einfluß auf die transformierenden Eigenschaften des IGF-1 Rezeptors. Eine Mutation der Tyrosinreste an Position 1250 und 1251 führte z.B. zu einem geringeren Tumorwachstum entsprechender Transfektanten in Nacktmäusen (Blakesley et al., 1996). Hongo et al. identifizierten mittels 'Softagar-Assays' eine Region zwischen den Aminosäureresten 1245 und 1310 als transformierende Domäne des IGF-1 Rezeptors, die nicht für die proliferativen Effekte des Rezeptors verantwortlich ist (Hongo et al., 1996). Zwar zeigt auch ein Rezeptor mit einer Mutation des juxtamembranen Tyrosinrestes an Position 950 geringere transformierende Eigenschaften als der Wildtyp Rezeptor, jedoch werden von dieser Mutation auch die mitogenen Eigenschaften des Rezeptors beeinflusst (Miura et al., 1995). Diese experimentellen Daten machen die C-terminale Domäne besonders attraktiv als Angriffspunkt für einen therapeutischen Ansatz zur Inhibierung der tumorigenen Eigenschaften des IGF-1 Rezeptors, da auf diese Weise die proliferative Funktion des Rezeptors in normalen Zellen erhalten bleiben würde.

1.7. Der IGF-1 Rezeptor und Tumorigenese

1.7.1. Expression von Komponenten des IGF-1-Systems in humanen Tumoren

Viele verschiedene Daten aus einer Reihe von zellbiologischen Untersuchungen und Experimenten mit Tumormodellen konnten belegen, daß der IGF-1 Rezeptor an fast allen Schritten der Tumorigenese von einer Stimulation der Proliferation und einem Schutz vor Apoptose über eine Regulation von Transformationsprozessen bis hin zu einer Förderung des Metastasierungspotentials von Zellen beteiligt ist.

Jedoch nicht nur in experimentellen Systemen sondern auch bei der Untersuchung von Tumorbiopsien stellte sich heraus, daß eine abnormale Expression des IGF-1 Rezeptors und seiner Liganden in vielen verschiedenen Tumortypen wie Lungenkarzinomen, Brust- und Prostatakarzinomen, Hepatomen, Kolon- und Pankreastumoren sowie in Meningiomen und Gliomen detektiert werden kann. (Macaulay, 1992). Da eine Tumorzelle oftmals sowohl den IGF-1 Rezeptor als auch IGF-1 exprimiert, scheint eine autokrine Wirkungsweise zu existieren, der die Tumorzelle von exogenem IGF-1 unabhängig macht und den Übergang zum tumorigenen Phänotyp fördert (Kiess et al., 1989).

Betrachtet man diese Daten zusammen mit den Ergebnissen aus experimentellen Studien, so weisen alle Befunde darauf hin, daß das IGF-1-Signaltransduktionssystem an der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines transformierten Phänotypes beteiligt ist.

1.7.2. Mögliche therapeutische Ansätze zur Inhibierung des IGF-1 Rezeptor-Signaltransduktionssystems

Es gibt eine Reihe von Anhaltspunkten, die dafür sprechen, daß der IGF-1 Rezeptor ein geeigneter therapeutischer Angriffspunkt für eine Anti-Tumorthérapie darstellen könnte. Zwar teilt der IGF-1 Rezeptor seine tumorigenen Eigenschaften mit einer Reihe von anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Onkogenen, jedoch weisen die experimentellen Daten auf Besonderheiten im IGF-1-System hin. Zum einen konnte in Nacktmäusen gezeigt werden, daß transplantierte Tumore, in denen die IGF-1 Rezeptor-Expression reprimiert worden war, nicht nur ein vermindertes Tumorstadium aufwiesen, sondern in einigen Fällen sogar eine komplette Inhibition der Tumorigenese zu beobachten war (D'Ambrosio et al., 1996). Zum anderen, und von besonderer Bedeutung für die Spezifität eines therapeutischen Ansatzes, führt eine Interferenz mit dem IGF-1 Rezeptor-Signaltransduktionssystem vor allem zu einer massiven Apoptose von Tumorzellen (siehe 1.5.2.), während normale Zellen in einem wesentlich geringeren Ausmaß betroffen sind. Beispielsweise können Tumorzellen mit einer Konzentration an Antisense-Oligonukleotiden gegen den IGF-1 Rezeptor abgetötet werden, die bei humanen diploiden Fibroblasten noch nicht zu einer Apoptose-Induktion führt (Baserga et al., 1997). Desweiteren gibt es auch keine Evidenz dafür, daß 'Knock-out-Mäuse', in denen das Gen für den IGF-1 Rezeptor deletiert ist, eine erhöhte Apoptoserate aufweisen (Liu et al., 1993).

Eine Reihe von therapeutischen Ansätzen sind denkbar, um die tumorigene Aktivität des IGF-1 Rezeptors zu inhibieren. Diese Ansätze werden auch als Strategien zur Hemmung anderer onkogener Rezeptor-Tyrosinkinasen diskutiert. Im folgenden soll auf die bestehenden Möglichkeiten der therapeutischen Interferenz mit biologischen Aktivitäten von Rezeptor-Tyrosinkinasen mit besonderem Schwerpunkt auf den IGF-1 Rezeptor eingegangen werden. Da Rezeptor-Tyrosinkinasen untereinander einen relativ hohen Grad an Homologien zueinander aufweisen, unterscheiden sich diese Ansätze vor allem in der Spezifität ihrer Wirkung.

(1) Inhibition der IGF-1 Rezeptor-Expression mittels Antisense-Strategien

Sehr eindrucksvolle Ergebnisse wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden gegen die kodierende Sequenz des IGF-1 Rezeptors erreicht. Eine auf diese Weise induzierte Hemmung der IGF-1 Rezeptor-Expression resultiert in einer massiven Apoptose von Tumorzellen (Resnicoff et al., 1995; Resnicoff et al., 1994), wobei dieser Effekt sich *in vivo* aufgrund einer durch die Antisense-Strategie induzierten Immunantwort ('host response') wesentlich stärker als *in vitro* bemerkbar macht [Baserga, 1995 #2]. Eine erste klinische Pilotstudie testet zur Zeit die Möglichkeit eines solchen therapeutischen Ansatzes zur Behandlung maligner Astrozytome (Andrews et al., 2001).

(2) Inhibition der Ligand-Rezeptor-Interaktion über monoklonale Antikörper

Die extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle der Rezeptor-Tyrosinkinase ist oftmals die Domäne, die am wenigsten Homologie zu anderen Rezeptoren aufweist. Daher hat ein therapeutischer Ansatz, in dem diese Liganden-Bindungsstelle blockiert wird, den Vorteil, daß spezifisch eine bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinase inhibiert wird, während die biologischen Funktionen anderer Rezeptoren unbeeinflusst bleiben.

Zwar ist eine Behandlung mit einem anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper als Anti-Tumor-Therapie noch nicht klinisch geprüft, jedoch gibt es eine Reihe von Hinweisen aus präklinischen Untersuchungen, daß eine solche Therapie erfolgversprechend für die Behandlung IGF-1 Rezeptor-überexprimierender Tumore wäre. Der anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper α IR3 blockiert in vielen Krebszelllinien sowohl in Zellkultur als auch in Tierexperimenten IGF-1 Rezeptor-regulierte Zellfunktionen (Arteaga und Osborne, 1989; Furlanetto et al., 1993; Gansler et al., 1989). In Kombination mit den chemotherapeutischen Agenzien Doxorubicin und Taxol oder mit 5-Fluorouracil erhöht α IR3 sogar die Cytotoxizität dieser Agentien für IGF-1 Rezeptor-überexprimierende Brustkrebs- bzw. Adenokarzinomzellen (Beech et al., 2001; Perer et al., 2000).

Ein sehr bekanntes Beispiel für einen schon in der Klinik verwendeten Antikörper gegen eine Rezeptor-Tyrosinkinase ist der humanisierte anti-ErbB2-Antikörper Herceptin, der in der Therapie von Brustkrebs bei Patientinnen mit ErbB2-überexprimierenden Tumoren bereits eingesetzt wird. Die Wirkung von Herceptin geht zum einen auf die Inhibition der sehr potenten Rezeptor Tyrosinkinase ErbB2 zurück, zum anderen wird jedoch auch durch solch eine Antikörpertherapie eine Immunantwort vor allem gegen Rezeptor-überexprimierende Tumorzellen induziert (Colomer et al., 2001). In einer klinischen Studie Phase III an Patientinnen mit ErbB2-überexprimierenden Tumoren konnte die Wirkung der Chemotherapie durch die Kombination mit Herceptin deutlich verbessert werden (Pietras et al., 1998). Bei Patientinnen mit progressivem Mammakarzinom mit ein bis zwei durchgeführten Chemotherapien zeigte Herceptin zudem auch alleine eine signifikante Wirkung (Cobleigh et al., 1999).

(3) Inhibition der Tyrosinkinase-Aktivität

Die biologische Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen ist in den meisten Fällen von der Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase abhängig. Daher bietet sich diese Domäne als Angriffspunkt für eine therapeutische Intervention sehr gut an. Problematisch bei diesem Ansatz ist jedoch, daß gerade diese Domäne und insbesondere in dieser Domäne die ATP-Bindungsstelle, die der Angriffspunkt für die meisten niedermolekularen Inhibitoren ist, sehr stark konserviert ist. Aus diesem Grund resultiert oftmals eine Inhibition der ATP-Bindungsstelle eines Rezeptors in der zusätzlichen Blockierung der biologischen Effekte anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen. Eine solche Nebenwirkung wäre z.B. im Falle des IGF-1 Rezeptors mit schwerwiegenden Folgen verbunden, da eine zusätzliche Inhibition der verwandten Insulin Rezeptor-Tyrosinkinase sehr wahrscheinlich ist.

Mehrere Kinase-Inhibitoren für verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen werden mittlerweile in klinischen Studien getestet. Dazu zählen ein PDGF Rezeptor-Inhibitor (SU101), der als Anti-Tumorthapeutikum bei fortgeschrittenen soliden Tumoren eingesetzt werden soll (Eckhardt et al., 1999), ein EGF Rezeptor-Inhibitor (ZD1839), der in Phase III als Therapeutikum gegen NSCLC (non small cell lung cancer) getestet wird (Baselga und Averbuch, 2000), sowie mehrere Angiogenese-Inhibitoren wie z.B. SU5416, der die Tyrosinkinase des VEGF Rezeptors inhibiert (Mendel et al., 2000).

Inhibitoren für die IGF-1 Rezeptor-Tyrosinkinase werden bislang noch nicht in klinischen Studien getestet. Jedoch gibt es Anstrengungen in der therapeutischen Forschung spezifische niedermolekulare Kinase-Inhibitoren für den IGF-1 Rezeptor zu identifizieren.

(4) Inhibition von Komponenten der durch Rezeptor-Tyrosinkinasen regulierten Signaltransduktionskaskaden

Eine weitere Möglichkeit die tumorigenen Effekte des IGF-1 Rezeptors zu inhibieren, wäre, an der Weiterleitung IGF-1-induzierter Signale beteiligte Kinasen zu inhibieren. In diesem Zusammenhang wird die Inhibition des PI3-Kinase-Signalweges durch eine Blockierung der Akt-Kinase oder eine Hemmung des MAP-Kinase Signalweges durch eine Inhibition der Raf- bzw. ERK-Kinasen diskutiert, was zu einer Induktion eines programmierten Zelltods von Tumorzellen führen würde (Sedlacek, 2000). Als Angriffspunkt für eine Inhibition dieser Kinasen würde sich, wie unter (3) diskutiert, die ATP-Bindungsstelle gut eignen. Aufgrund der oben erwähnten starken Konservierung der ATP-Bindungsstelle würde diese Strategie jedoch die zusätzliche Inhibition anderer Kinasen und damit unerwünschte Nebeneffekte zur Folge haben

Als ein weiterer Ansatz zur Hemmung IGF-1-induzierter Signale wäre vorstellbar, die Interaktion des Rezeptors mit spezifischen zytoplasmatischen Bindungspartnern zu inhibieren. Da jedoch bislang fast alle identifizierten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors auch an den sehr verwandten Insulin Rezeptor binden, wäre ein solcher Ansatz zumindest mit der zusätzlichen Inhibition Insulin-induzierter zellulärer Effekte verbunden. Aus diesem Grund könnte die Identifizierung spezifischer Signalproteine des IGF-1 Rezeptors durchaus von therapeutischer Relevanz sein, da eine Blockierung der Interaktion zwischen diesen potentiellen Bindungspartnern und dem IGF-1 Rezeptor zu einer spezifischen Inhibition IGF-1-induzierter tumorigener Effekte führen würde, während beispielsweise Insulin-abhängige zelluläre Funktionen unbeeinflusst bleiben würden.

(5) Neutralisierung von IGF-1 durch IGF-Bindeproteinen

Da die Bindeproteine eine höhere Affinität für IGF-1 aufweisen als der IGF-1 Rezeptor selbst, könnte durch den Einsatz einer erhöhten Konzentration an diesen Bindeproteine die Bindung von IGF-1 an seinen Rezeptor und damit seine Aktivierung inhibiert werden. Allerdings müssen bei diesem Ansatz die IGF-1-unabhängigen Funktionen der Bindeproteine mitberücksichtigt werden.

2. Das 2-Hybrid-System

Durch die Entwicklung des 2-Hybrid-Systems entstand erstmals die Möglichkeit, Proteine zu identifizieren, die direkt in Zellen miteinander interagieren. In den letzten zehn Jahren entwickelte sich dieses System und seine Varianten zu einer äußerst nützlichen Methode, Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren und zu analysieren. Diese Technik führte bereits zu der Identifizierung einer Vielzahl von Proteinen, die wichtige zelluläre Funktionen beeinflussen.

Da dieses System im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu der Isolierung von Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors führte, soll im folgenden ein kurzer Überblick über diese Methode und ihre Anwendungsmöglichkeiten gegeben werden.

2.1. Das Prinzip des 2-Hybrid-Systems

Der 2-Hybrid-Technologie liegen zwei essentielle Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren zugrunde. Einerseits weisen eukaryotische Transkriptionsfaktoren eine modulare Struktur mit zumindest zwei diskreten Domänen auf, einer DNS-Bindungsdomäne und einer Transaktivierungsdomäne (Brent und Ptashne, 1985). Andererseits brauchen diese beiden Domänen nicht Bestandteil eines einzigen Polypeptids zu sein, um ihre Funktion als aktiver Transkriptionsfaktor

ausüben zu können, sondern müssen lediglich in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden (Ma und Ptashne, 1988).

Von dieser Modularität von Transkriptionsfaktoren gingen Fields und Song bei der Entwicklung des 2-Hybrid-Systems aus und zeigten erstmals, daß die Transkription eines Hefe-Reporter-Gens dazu verwendet werden kann, die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu demonstrieren, wobei der eine Interaktionspartner an die DNS-Bindungsdomäne (BD) und der andere Bindungspartner an die Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors fusioniert ist (Fields und Song, 1989). Desweiteren schlugen die Autoren vor, daß aus einer cDNS-Bibliothek, die für AD-Fusionsproteine kodiert, Interaktionspartner für ein Protein von Interesse, das an eine DNS-Bindungsdomäne fusioniert ist, selektioniert werden können.

Die gängigen Systeme beinhalten drei wichtige Komponenten (Abbildung 3):

- (1) einen Vektor, der die Expression eines Proteins, für das Interaktionspartner identifiziert werden sollen, vermittelt. Dieses Protein ist an eine DNS-Bindungsdomäne (GAL4, LEXA) fusioniert und wird als Köder ('*bait*') bezeichnet.
- (2) einen Vektor, der die Expression einer cDNS-Bibliothek vermittelt. Die durch die cDNS-Bibliothek kodierten Proteine sind an eine Aktivierungsdomäne (GAL4, VP16) fusioniert und werden als Fisch ('*fish*') oder Beute ('*prey*') bezeichnet.
- (3) ein Reportergen, welches die spezifische DNS-Bindungsstelle ('*upstream activating sequence*', UAS) enthält, die von dem Köder-Protein erkannt wird. In der Regel kodieren diese Reportergene für die *E. coli* β -Galactosidase (lacZ) oder für Enzyme, die an der Biosynthese von Aminosäuren beteiligt sind (z.B. *HIS3*).

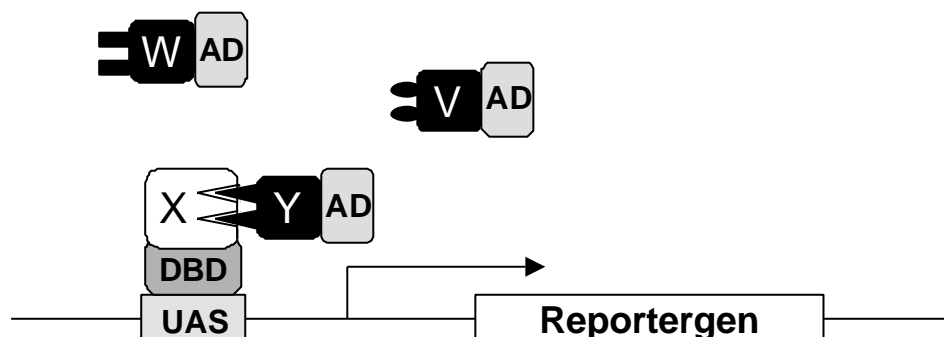


Abbildung 3: Schematische Darstellung des 2-Hybrid-Systems. Protein X, das Köder-Protein, ist an eine DNS-Bindungsdomäne (DBD) fusioniert, das Fisch-Protein Y, das durch eine cDNS-Bibliothek kodiert ist, an eine Aktivierungsdomäne (AD). Interaktion zwischen X und Y resultiert in der Rekonstitution eines aktiven Transkriptionsfaktors, der im folgenden durch die Bindung an eine UAS ('*upstream activating sequence*') ein Reportergen (*HIS3*, *lacZ*) aktiviert. Die Fisch-Proteine V und W, die ebenfalls durch die cDNS-Bibliothek kodiert sind, können nicht mit dem Köder-Protein X interagieren, es wird kein aktiver Transkriptionsfaktor rekonstituiert und damit auch nicht das entsprechende Reportergen aktiviert.

Das Köder-Fusionsprotein und die Fisch-Fusionsproteine werden in dem entsprechenden Hefestamm auf Interaktion untersucht. Nur wenn die beiden Proteine miteinander interagieren können, entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der die oben erwähnten Reportergene aktivieren kann und Wachstum in Abwesenheit einer bestimmten Aminosäure bzw. Expression der bakteriellen β -Galaktosidase ermöglicht.

2.2. Anwendung des 2-Hybrid-Systems für die Suche nach Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors

Das 2-Hybrid-System wurde schon in sehr vielen Studien für die Identifizierung von Interaktionspartnern von Rezeptor-Tyrosinkinasen verwendet. Auch manche wichtige Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors konnten mittels dieser Methode bereits identifiziert werden. Dazu zählen beispielsweise die p85-Untereinheit der PI3-Kinase (Lamothe et al., 1995), IRS-1 und SHC (Dey et al., 1996). Somit erschien dieses experimentelle System als sehr vielversprechend, um weitere neue zytoplasmatische Interaktionspartner dieser Rezeptor-Tyrosinkinase im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu finden.

Der IGF-1 Rezeptor ist ein Zelloberflächen-Protein und besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Anteil. Da für die Identifizierung von intrazellulären Interaktionspartnern nur der zytoplasmatische Anteil der β -Untereinheit interessant war, wurde auch nur diese Domäne des Rezeptors als Köder in den 2-Hybrid-Studien verwendet.

Für die Suche nach Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor boten sich verschiedene Varianten des 2-Hybrid-Systems an, die sich vor allem in der DNS-Bindungsdomäne des Köder-Proteins unterscheiden. Die beiden am häufigsten verwendeten DNS-Bindungsdomänen sind in diesem Zusammenhang die DNS-Bindungsdomäne der bakteriellen Transkriptionsfaktoren Gal4 und LexA. Die LexA-Bindungsdomäne zeichnet sich gegenüber der Gal4-Bindungsdomäne dadurch aus, daß sie Dimere bildet. Diese Eigenschaft machte diese DNS-Bindungsdomäne besonders attraktiv für die Suche nach Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor, da aufgrund der Dimerisierung zwei zytoplasmatische Domänen des Rezeptors in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden. Dadurch wird die Situation im aktivierten Wildtyp Rezeptor simuliert, und es kommt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne und im folgenden zu einer Kreuz-Phosphorylierung der beiden β -Untereinheiten (Abbildung 4). Durch diese Strategie können nicht nur Bindungspartner gefunden werden, die an den nicht-aktivierten Rezeptor binden, sondern auch solche, deren Bindung von phosphorylierten Tyrosinresten im Rezeptor abhängt. Aufgrund dieser Vorteile der LexA- gegenüber der Gal4-DNS-Bindungsdomäne wurde für das '2-Hybrid-Screening' nach Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors in der vorliegenden Arbeit ein Köder-Fusionsprotein aus der LexA-DNS-Bindungsdomäne und der zytoplasmatischen Domäne der β -Untereinheit des IGF-1 Rezeptors verwendet.

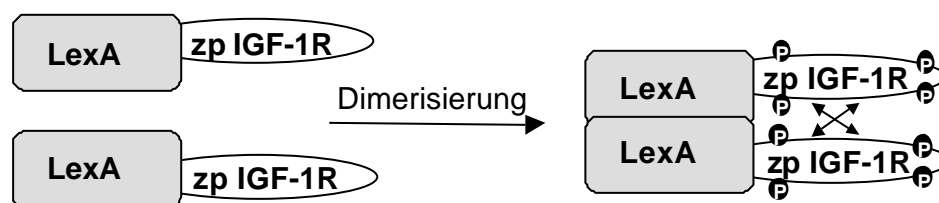


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus LexA-Bindungsdomäne und der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors. Durch die Dimerisierung der LexA-Untereinheiten wird die Situation im aktivierten Wildtyp Rezeptor simuliert, so daß es zu einer Phosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten kommt. zp IGF-1 R, zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit des IGF-1 Rezeptors.

Die Wahl der Transaktivierungsdomäne, an die die cDNS-Bibliothek fusioniert ist, ist von geringerer Bedeutung für die erfolgreiche Durchführung eines '2-Hybrid-Screens'. Zwei häufig verwendete

Transaktivierungsdomänen sind die VP16-Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus und die Transaktivierungsdomäne des bakteriellen Transkriptionsfaktors Gal4. Von wesentlich größerer Bedeutung ist die Auswahl der cDNS-Bibliotheken, die sich in ihrer Qualität deutlich voneinander unterscheiden. Ein Hinweis darauf, daß die Verwendung einer bestimmten cDNS-Bibliothek zu der Identifizierung vielversprechender Interaktionspartner führt, ist, welche anderen Protein-Protein-Interaktionen in dieser Bibliothek schon gefunden wurden. Aus der in dieser Arbeit verwendeten Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek wurden schon sehr viele interessante Signalproteine isoliert wie das mit dem c-met-Rezeptor interagierende Gab-1 (Weidner et al., 1996) oder FMIP, ein an den c-fms-Rezeptor-bindendes Protein (Tamura et al., 1999). Auch mittels 'Screening' der Jurkat-cDNS-Bibliothek, die ebenfalls für die Suche nach Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors benützt wurde, wurden vielversprechende Protein-Interaktionen identifiziert, z.B. hSiah2 als neues vav-bindendes Protein (Germani et al., 1999).

Als Reportergen wurde das *HIS3*-Gen gewählt, das in das Genom eines *S. cerevisiae* Hefestammes (L40) integriert wurde, in dem das endogene *HIS3*-Gen ausgeschaltet worden war. Das *HIS3*-Gen kodiert für die Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase, ein Enzym, das an der Biosynthese von Histidin beteiligt ist. Kommt es durch eine Interaktion von Köder- und Fisch-Protein zu einer Aktivierung des Reportergens, können die mit Köder- und Fisch-Vektor transfektierten Hefen auf Histidin-freiem Medium wachsen. Transfektierte Hefen, in denen keine Protein-Protein-Interaktion zwischen Köder- und Fisch-Protein stattfindet, zeigen dagegen kein Wachstum in der Abwesenheit von Histidin. Die Histidin-Selektion hat den Vorteil, daß über die Verwendung von 3-Aminotriazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes, auf starke Protein-Protein-Interaktionen selektioniert werden kann. Durch die Anwesenheit von 3-AT ist eine stärkere Transkription des *HIS3*-Reportergens notwendig, um der Inhibition durch 3-AT entgegenzuwirken. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestamm L40 verfügt noch über ein zweites Reportergen, das Gen für die bakterielle β -Galaktosidase (*lacZ*). Die erfolgreiche Interaktion zwischen Köder- und Fisch-Protein und damit die Expression des *lacZ*-Gens kann durch die Umsetzung eines chromogenen Indikators in ein farbiges Produkt erkannt werden.

2.3. Vorteile und Grenzen des 2-Hybrid-Systems

Vor der Entwicklung des 2-Hybrid-Systems war die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen sehr aufwendig. Es mußte auf extensive biochemische 'Assay'-Systeme und genetische 'Screens' zurückgegriffen werden, um neue Bindungspartner für Proteine zu finden (Allen et al., 1995).

Das 2-Hybrid-System stellt dagegen eine sehr effektive Methode zur Isolierung neuer Protein-Protein-Interaktionen dar, da sie lediglich auf der Aktivierung eines Reportergens beruht. Vor allem zeichnet sich diese Methode gegenüber traditionellen Methoden dadurch aus, daß für ein Protein in sehr kurzer Zeit sehr viele Interaktionspartner gefunden werden können. Innerhalb von zwei Wochen kann ein 'Screening' nach Bindungspartnern für ein Protein durchgeführt werden. Außerdem interagieren die zu untersuchenden Proteine direkt in Zellen miteinander. Aufgrund der hohen Sensitivität des Systems können zudem noch Interaktionen detektiert werden, die mittels Methoden wie Immunpräzipitation nicht mehr gefunden werden. Interaktionen mit einer Dissoziationskonstante unter 70 μ M konnten im 2-Hybrid-System noch detektiert werden (Yang et al., 1995). Die hohe Sensitivität des Systems ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Einerseits werden die Hybridproteine aufgrund starker Promotoren und der Verwendung von 'high-copy'-Plasmiden stark überexprimiert, was die Bildung von

Komplexen sicherlich fördert. Andererseits wird wahrscheinlich die Stabilität der Interaktion zwischen Köder- und Fisch-Protein durch die Interaktion der Aktivierungsdomäne des Fisch-Proteins mit dem Transkriptionsinitiationskomplexes verstärkt. Die Bildung eines ternären Komplexes an dem Promoter des Reportergens erhöht die Gesamtstabilität des Komplexes und damit auch die Wahrscheinlichkeit der Detektion einer Interaktion (Allen et al., 1995). Außerdem werden die durch die Aktivierung des Reportergens entstandenen Transkripte sicherlich mehrfach translatiert, so daß letztendlich multiple Genprodukte pro Transkript vorhanden sind und das primäre Signal amplifiziert wird.

Trotz dieser Vorteile, die das 2-Hybrid-System gegenüber anderen Methoden aufweist, sind seine Anwendungsmöglichkeiten begrenzt. Aufgrund der Tatsache, daß die DNS-Bindungs- und Transaktivierungs-Hybrid-Proteine in den Kern translozieren, um dort die Aktivierung eines Reportergens zu induzieren, können beispielsweise für eine Interaktion notwendige post-translationale Modifikationen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums wie Glykosylierungen und Bildung von Disulfid-Brücken nicht stattfinden. Proteine, die sich im Zytoplasma nicht korrekt falten, können im 2-Hybrid-System ebenfalls nicht untersucht werden. Allerdings ist es beispielsweise durch Modifikationen des Systems möglich, Phosphotyrosin-abhängige Interaktionen zu untersuchen (s.o.). Außerdem werden in Hefen Serin/Threonin-Kinasen exprimiert, so daß auch Phosphoserin- und Phosphothreonin-abhängige Interaktionen detektiert werden können.

Eine andere Limitation des Systems ist, daß einige Köder-Proteine die Transkription des Reportergens in der Abwesenheit eines spezifischen Transaktivierungsdomänen-Hybridpartners induzieren können. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, daß das Protein, das an die DNS-Bindungsdomäne fusioniert wurde, entweder eine Funktion als Transkriptionsaktivator besitzt oder Domänen aufweist, die wirklichen Transaktivierungsdomänen ähneln. Ob das zu untersuchende Köder-Protein diese Eigenschaft aufweist, kann jedoch sehr einfach festgestellt werden, indem das Köder-Protein alleine auf Aktivierung des Reportergens getestet wird. Ein anderes Problem bei der Anwendung des 2-Hybrid-Systems ist die letale Wirkung einiger Proteine. Aufgrund der Konserviertheit vieler essentieller zellulärer Prozesse in Eukaryoten ist es nicht überraschend, daß die Überexpression bestimmter Gene in Hefe mit normalen zellulären Ereignissen interferiert.

Das bei der Durchführung von '2-Hybrid-Screens' am häufigsten beobachtete Problem ist jedoch die Selektion falschpositiver Klone, die zunächst aufgrund ihrer Fähigkeit, die Transkription des Reportergens in der Anwesenheit des Köder-Proteins zu aktivieren, isoliert werden. In anschließenden 2-Hybrid-Untersuchungen stellt sich jedoch heraus, daß diese Proteine mit einer Reihe anderer nicht relevanter Bindungspartner ebenfalls interagieren können. Es wäre vorstellbar, daß diese Proteine Oberflächen besitzen, die eine niedrige Bindungsaffinität für viele verschiedene Proteine aufweisen, was in einer Komplexbildung mit diesen Proteinen im 2-Hybrid-System und letztendlich in der Transkription des Reportergens resultiert. Desweiteren könnten solche Falschpositiven eine niedrige Bindungsaffinität für sehr viele verschiedene Promotorelemente besitzen und aufgrund dieser Eigenschaft auch das Reportergen aktivieren. Solche Falschpositiven können jedoch sehr leicht in 2-Hybrid-Experimenten detektiert werden, indem die in einem '2-Hybrid-Screen' isolierten Proteine zusammen mit einem nicht-relevanten Bindungspartner exprimiert werden und die Aktivierung des Reportergens kontrolliert wird.

Aus diesen Ausführungen geht deutlich hervor, daß das 2-Hybrid-System gegenüber anderen experimentellen Systemen viele Vorteile besitzt, jedoch auch in seinen Anwendungsmöglichkeiten limitiert ist. Die meisten dieser Beschränkungen hängen jedoch von dem jeweils zu untersuchenden

Protein, für das Interaktionspartner gefunden werden sollen, ab und stellen keine generellen Probleme dieses Systems dar.

2.4. Varianten des 2-Hybrid-Systems

Das 2-Hybrid-System ist im Laufe der Zeit zu einem essentiellen genetischen Werkzeug geworden, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. In den letzten Jahren wurde diese Methode weiterentwickelt. Eine Reihe von Varianten dieser Methode ermöglichen die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, die mit dem herkömmlichen System nicht untersucht werden können.

(1) Das 3-Hybrid-System

Mit Hilfe des 3-Hybrid-Systems können Proteinkomplexe untersucht werden, in denen die Interaktion zwischen zwei Proteinen durch ein drittes Protein vermittelt wird. Beispielsweise konnte in diesem System die Grb2-vermittelte Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne des EGF Rezeptors und Sos gezeigt werden (Zhang und Lautar, 1996). Einer abgewandelten Form dieses Systems liegt zugrunde, daß einige Protein-Interaktionen von der Tyrosinphosphorylierung des einen Bindungspartners abhängig sind. Osborne et al. entwickelten aus diesem Grund ein 3-Hybrid-System, in dem als drittes Protein in den entsprechenden Hefen eine Tyrosinkinase exprimiert wird, und konnten zeigen, daß die Interaktion zwischen dem IgE Rezeptor FcεRIγ und dem SH2-Domänen-Protein ITAM von der Expression der Tyrosinkinase Lck abhängt (Osborne et al., 1995).

(2) Das reverse 2-Hybrid-System

Das reverse 2-Hybrid-System wurde entwickelt, um gegen die Interaktion zweier Proteine selektionieren zu können. Unter Verwendung dieser Methode können Mutationen in Proteinen identifiziert werden, die die Assoziation mit einem anderen Protein verhindern. Auch das 'Screening' nach niedermolekularen Substanzen, die die Interaktion zweier Proteine unterbinden, wäre mit dieser Methode denkbar. Das reverse 2-Hybrid-System macht sich die Tatsache zunütze, daß es in Hefe 'gegenselektierbare' Reportergene gibt (Vidal et al., 1996). Beispielsweise werden Hefen durch die Expression des *URA3*-Gens sensitiv für 5-Fluoro-Orotsäure (5-FOA). Können Köder- und Fisch-Protein miteinander interagieren, kommt es zu der Transkription des *URA3*-Reportergens. Das daraus resultierende Genprodukt setzt 5-FOA in eine für die Hefen toxische Substanz um, was letztendlich das Wachstum dieser Zellen verhindert. Bei Anwesenheit einer Mutation oder einer niedermolekularen Substanz, die die Interaktion von Köder- und Fisch-Protein unterbinden, kann das *URA3*-Reportergen dagegen nicht aktiviert werden, so daß die Zellen in Anwesenheit von 5-FOA wachsen können. Damit kann auf solche Klone selektioniert werden, in denen keine Interaktion zwischen Köder- und Fisch-Protein stattfindet.

(3) Das 'Sos Recruitment System' (SRS)

Das SR-System stellt eine Alternative zu dem herkömmlichen 2-Hybrid-System dar, da es die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen an der Hefe-Plasmamembran ermöglicht (Aronheim et al., 1997). In diesem System können daher beispielsweise Interaktionen von Proteinen analysiert werden, die eine Funktion als Transkriptionsfaktoren haben, was im 2-Hybrid-System aufgrund der eigenen Transaktivierungs- und DNS-Bindungsdomänen dieser Proteine nicht möglich ist. Das SR-System verwendet eine temperatursensitive Mutante des GEF-Proteins ('guanyl nucleotide exchange factor') im ras-Signalweg von Hefen (*cdc25-2*), das das ras-Protein bei 36°C nicht aktivieren kann. Die Funktion dieses GEF-Proteins kann jedoch von dem Sos-Protein der Säugetiere übernommen werden, wenn dieses in unmittelbare Nähe zur Zellmembran gebracht wird. Dies wird im SR-System

durch zwei Hybrid-Proteine erreicht: Sos wird an das Protein X fusioniert und Protein Y wird mit einem Myristoylierungssignal versehen, was in einer Lokalisierung an die Zellmembran resultiert. Eine Interaktion zwischen Protein X und Y ermöglicht so die Aktivierung von ras durch Sos und im folgenden ein Wachstum der Hefen bei 36°C.

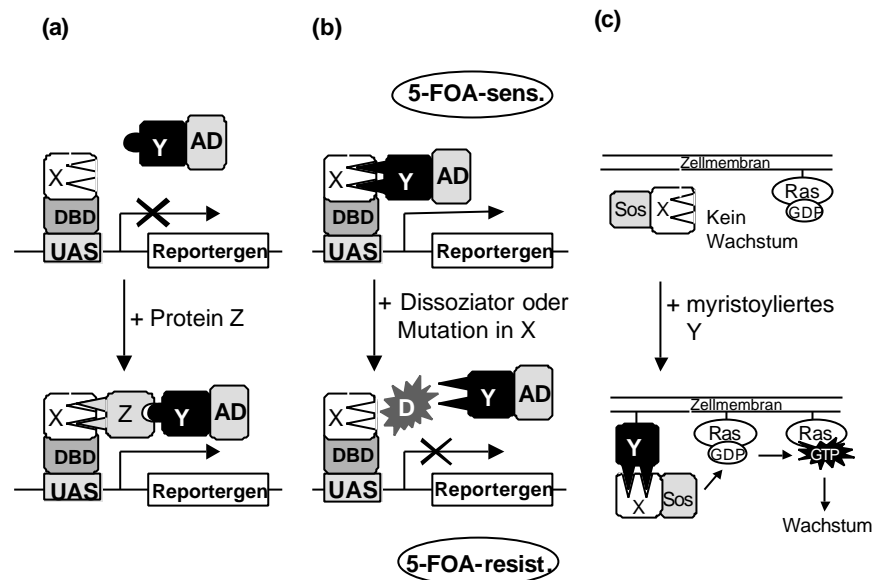


Abbildung 5: Varianten des 2-Hybrid-Systems. (a) Im 3-Hybrid-System wird die Interaktion zwischen Protein X und Y, die an eine DNS-Bindungsdomäne bzw. Transaktivierungsdomäne fusioniert sind, durch Protein Z vermittelt. Nur in Anwesenheit von Z kommt es zu einer Aktivierung des Reportergens. (b) Im reversen 2-Hybrid-System können Protein X und Y in Abwesenheit eines Dissoziationsfaktors (D) miteinander interagieren und das Reportergen für das URA3-Genprodukt aktivieren. Damit kann 5-FOA in ein für die Hefezellen toxisches Produkt umgesetzt werden. In Anwesenheit von D oder durch eine Mutation von Y wird dagegen die Interaktion zwischen X und Y verhindert. (c) Das SR-System ermöglicht die Untersuchung von Protein-Interaktionen an der Zellmembran. Protein X wird an das GEF-Protein Sos fusioniert, und Protein Y wird durch ein Myristoylierungssignal an der Zellmembran verankert. Durch eine Interaktion zwischen X und Y wird Sos in die unmittelbare Nähe des Membran-assoziierten Ras gebracht und so der ras-Signalweg aktiviert. UAS, 'upstream activating sequence'.

2.5. Das 2-Hybrid System in der Post-Genom-Ära

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms, die im Jahre 2000 abgeschlossen wurde, gibt Aufschluß über den Gesamtbestand an Genprodukten des menschlichen Organismus. Nun werden Anstrengungen unternommen, die zelluläre Funktion dieser 100 000 menschlichen Genprodukte aufzuklären. Mit Hilfe einer Reihe von experimentellen Techniken sollen einerseits auf DNS-Ebene und andererseits auf Protein-Ebene individuelle Genfunktionen erforscht werden (Dutt und Lee, 2000).

Die Untersuchung der mRNA-Expression mittels 'DNS-Microarrays' kann beispielsweise Unterschiede in der Genexpression während der Entwicklung oder zwischen verschiedenen Zelltypen detektieren. Durch das Ausschalten jedes einzelnen Gens ('Knockout-Untersuchungen') können ebenfalls Informationen über die entsprechenden Genprodukte erhalten werden. Auch die Identifizierung von Homologien zu bekannten Proteinen anderer Organismen kann dabei helfen, einigen Proteinen eine putative Funktion zuzuschreiben (McDonald und Yates, 2000).

Letztendlich wird jedoch nur die Untersuchung der Proteine selbst ihre Funktion aufklären. Die Analyse der Expression, Lokalisation und Interaktion von Proteinen wird zusammenfassend als 'Proteomics' bezeichnet. In der Proteomics-Forschung werden anhand einer Kombination verschiedener Techniken wie 2D-Gelelektrophorese, Massenspektroskopie, Aminosäure-Sequenzierung aber auch extensiver Protein-Interaktionsstudien Proteine quantifiziert und charakterisiert (Chambers et al., 2000). Gerade die Kartierung aller Proteininteraktionen eines Organismus könnte Aufschluß über die Funktion bislang völlig unbekannter Proteine dadurch geben, daß diese in Zusammenhang mit Proteinen gebracht werden könnten, deren Funktion bereits aufgeklärt ist. Neben der Massenspektroskopie werden zur Zeit Hochdurchsatz-2-Hybrid-Techniken entwickelt, um die genomweite Untersuchung von Protein-Interaktionen durchführen zu können (Chen und Han, 2000). Mittels Hochdurchsatz-2-Hybridtechniken konnten bereits von zwei verschiedenen Forschergruppen unbekannte Protein-Interaktionen in *C. elegans* und *S. cerevisiae* detektiert werden (Uetz et al., 2000; Walhout et al., 2000). Beide Forschergruppen wendeten eine effiziente, kosteneffektive Strategie an, um zunächst möglichst viele kodierende Sequenzen zu amplifizieren und mittels einer Rekombinationsreaktion in Köder- und Fisch-2-Hybrid-Vektoren zu klonieren. Auf diese Weise stellten sie sowohl DNS-Bindungs- als auch Transaktivierungs-Domänen-cDNS-Bibliotheken her, die getrennt in einen haploiden α - bzw. α -Hefestamm transfektiert wurden. Nach einer Paarung der haploiden Hefen ('Mating') werden die nun diploiden Hefen auf Aktivierung eines Reportergenes, d.h. auf Interaktion von Köder- und Fisch-Protein, getestet. Uetz et al. konnten so unter Verwendung von DNS-Bindungsdomänen- und Transaktivierungsdomänen-Bibliotheken, in denen alle kodierenden Sequenzen des Hefegenoms (ca. 6000) vertreten waren, 957 interagierende Protein-Paare identifizieren (Uetz et al., 2000). Über eine computergestützte Analyse der Daten konnten bisher nicht-charakterisierte Proteine in einen biologischen Kontext eingeordnet werden und neue Interaktionen zwischen bekannten Proteinen detektiert werden, die biologische Funktionen in einen größeren zellulären Zusammenhang bringen. Es ist ersichtlich, daß diese Methode eine potente Technik darstellt, um die durch die Sequenzierung des Genoms aufgeworfene Frage nach der Funktion der jeweiligen Genprodukte über ihre Einordnung in Proteinkomplexe, -netzwerke und Signaltransduktionswege in einem gewissen Maße beantworten zu können. Sicherlich könnte man diese Methode auf die Analyse des wesentlich umfangreicheren menschlichen Genoms ausweiten, um die Entstehung menschlicher Krankheiten besser verstehen zu können und neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden (Chen und Han, 2000).

3. Aufgabenstellung

Das IGF-1 Rezeptor-Signalsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen. Die Überexpression von Ligand und/oder Rezeptor ist eine Eigenschaft vieler Tumorzelllinien und kann zu der Bildung von Tumoren in Tiermodellen führen. Außerdem ist der aktivierte IGF-1 Rezeptor an der Vermittlung der transformierenden Aktivität verschiedener Onkogene beteiligt. Umgekehrt resultiert eine Interferenz mit dem IGF-1 Rezeptor-Signalsystem in einer Reversion des transformierten Phänotyps und in einer Inhibition des Tumorwachstums.

Einige Signalproteine, die an den IGF-1 Rezeptor binden, wurden bereits identifiziert (IRS-1, SHC, p85 etc.). Keines dieser Signalproteine ist jedoch spezifisch für diesen Rezeptor, sondern all diese Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors sind auch an den Signalwegen anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen vor allem des sehr verwandten Insulin Rezeptors beteiligt. Damit können diese Proteine nicht ausschließlich für die Vermittlung der spezifischen biologischen Funktionen des IGF-1 Rezeptors verantwortlich sein. Daher ist anzunehmen, daß weitere bislang nicht identifizierte spezifische Bindungspartner für den IGF-1 Rezeptor existieren, die an der Signalweiterleitung der tumorigenen Effekte des Rezeptors beteiligt sind und aus diesem Grund interessante therapeutische Angriffspunkte für die Krebsforschung darstellen könnten.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, solche IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteine mittels des 'Hefe-2-Hybrid-Systems' zu identifizieren. Die Spezifität der Bindung sollte über die Analyse der Interaktion zwischen diesen Proteinen und anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen einschließlich des sehr verwandten Insulin-Rezeptors ebenfalls im '2-Hybrid-System' evaluiert werden. Spezifische IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine sollten dann in Bezug auf ihre Bindung an den IGF-1 Rezeptor näher charakterisiert und ihre funktionelle Relevanz im IGF-1-Signalsystem aufgeklärt werden.

Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Alle unten nicht aufgeführten Lösungsmittel, Chemikalien und Medienbestandteile wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), von Merck (Darmstadt), von GibcoBRL (Eggenstein) und von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle Enzyme, Reaktionspuffer, Nukleotide, Längenstandards und sonstige molekularbiologische Reagenzien von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) oder GibcoBRL (Eggenstein).

Enzyme und Chemikalien	Bezugsquelle
Aerosil	Degussa, Frankfurt
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Alkalische Phosphatase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Big Dye Terminator RR-Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie	Biorad, München
DEAE Sepharose fast flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethidiumbromid	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Exonuklease I	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)	Serva, Heidelberg
Rainbow coloured protein Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tris-HCl-Polyacrylamid-Gele (7,5 bzw. 12 %)	Biorad, München
Tween-20	Serva, Heidelberg

1.2. Standardpuffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \approx 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
SSC, 20x	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
TAE, 10x	0,4 M Tris-Acetat, 0,2 M Eisessig, 0,1 M EDTA, pH 8,4

1.3. Geräte

Geräte	Bezugsquelle
3CCD-Farbvideokamera DXC-950P	Sony, Köln
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	GibcoBRL, Eigenstein
CO_2 -Brutschrank	Heraeus Instruments, München
Elektroporationsapparatur	Biorad, München
ELISA-Reader	Tecan
Fluoreszenzmikroskop BX-60	Olympus, Hamburg
GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Kapillarsequenziergerät 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
SDS-PAGE-Kammer	Biorad, München
Spektrophotometer Uvikon 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Westernblot-Apparatur	Biorad, München

Geräte	Bezugsquelle
Zentrifuge, RC-5B	Sorvall, Bad Homburg

1.4. 'Kits' und fertige Lösungen

Kits und fertige Lösungen	Bezugsquelle
Blocking Solution	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DIG Easy Hyb	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DyeEx Spin Kit	Qiagen, Hilden
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Pure PCR Purification Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Protein Assay Dye Reagent	Biorad, München
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Titan One Tube RT-PCR System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
Tripure	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

1.5. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei MWG (München) synthetisiert.

Oligonukleotid	5'-3'-Sequenz	Verwendung
I1-sense	TCCGGAATTCCCGGGGAGAAAGAGAA ATAACAGCAGGCTGG	Klonierung der zp Domäne des IGF-1R in BTM116
I1-reverse	TCCGGTCGACGGATCCAAGGATCAGCA GGTCGA	Klonierung der zp Domäne des IGF-1R in BTM116
I2-sense	TCCGGAATTCAGAAAGAGAAATAACA GCAGGCTGG	Klonierung der zp Domäne des IGF-1R in BTM116
IIP-1-sense	GAAACCCACAGGAGGCAA	Klonierung von IIP-1 in pCR2.1
IIP-1-reverse	GGTCATCATCGCAGGGTC	Klonierung von IIP-1 in pCR2.1
VP16-IIP-1-sense	AGCTTGCGGCCGCTCATCATGCCGCTG GGACTGGG	Klonierung von IIP-1 in VP16
VP16-IIP-1-reverse	AGCTTGCGGCCGCGAATTCCTAGTAGC GGCCGACCT	Klonierung von IIP-1 in VP16
VP16-IIP-1/p26-sense	AGCTTGCGGCCGCTCATTATGTTCTGC ACCCTGAACACC	Klonierung von IIP-1/p26 in VP16
PDZ-sense	AGCTTGCGGCCGCTCGGGCTGGAGGAC TTCATCT	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 in VP16
PDZ-reverse	AGCTTGCGGCCGCGAATTCCTAGCGGC CAGCCGCTGAAC	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 in VP16
PDZΔN-sense	AGCTTGCGGCCGCTCGGGGCCGGCTAC GCC	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 mit N-term. Delet. in VP16
PDZΔN-reverse	GCGGCCGCGAATTCCTATTCTGTGAGT TTGAGGGTG	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 mit N-term. Delet. in VP16
PDZΔC-sense	AGCTTGCGGCCGCTCGGGCAGCGCAAA GAGGT	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 mit C-term. Delet. in VP16
PDZΔC-reverse	AGCTTGCGGCCGCGAATTCCTAGCCCA GCAGGCTCTGC	Klonierung der PDZ-Domäne von IIP-1 mit C-term. Delet. in VP16
IGF-1R*-sense	AATTCCCGGGGCGGGCCTTGCCGCTGC CCCAGTCTTCGACCTGCTGAG	Klonierung eines C-terminalen IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*-reverse	TCGACTCAGCAGGTCGAAGACTGGGGC AGCGGCAAGGCCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen IGF-1R-Peptids in BTM116

Oligonukleotid	5'-3'-Sequenz	Verwendung
IR*-sense	AATTCCCGGGGCGGATTCTGACCTTGC CTCGGTCCAATCCTTCCTGAG	Klonierung eines C-terminalen IR-Peptids in BTM116
IR*-reverse	TCGACTCAGGAAGGATTGGACCGAGG CAAGGTCAGAATCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen IR-Peptids in BTM116
IR*NPS→STC-sense	AATTCCCGGGGCGGATTCTGACCTTGC CTCGGTCTCGACCTGCTGAG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IR*NPS→STC-reverse	TCGACTCAGCAGGTCGAGGACCGAGG CAAGGTCAGAATCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*S→N-sense	AATTCCCGGGGCGGGCCTTGCCGCTGC CCCAGTCTAATACCTGCTGAG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*S→N-reverse	TCGACTCAGCAGGTATTAGACTGGGGC AGCGGCAAGGCCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*T→P-sense	AATTCCCGGGGCGGGCCTTGCCGCTGC CCCAGTCTTCGCCTTGCTGAG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*T→P-reverse	TCGACTCAGCAAGGCGAAGACTGGGG CAGCGGCAAGGCCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*C→S-sense	AATTCCCGGGGCGGGCCTTGCCGCTGC CCCAGTCTTCGACCTCCTGAG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
IGF-1R*C→S-reverse	TCGACTCAGGAGGTCAAGACTGGGG CAGCGGCAAGGCCCGCCCCGGG	Klonierung eines C-terminalen mut. IGF-1R-Peptids in BTM116
Tre-IIP-1-sense	AGCTCAGAATTCATGGACTACAAGGAC GACGA	Klonierung von IIP-1 in pTre
Tre-IIP-1-reverse	AGCTCAGGATCCCTAGTAGCGGCCGAC CTTG	Klonierung von IIP-1 in pTre
IIP-10-sense	AGCTTGCGGCCGCGAGATGTCGAGACCC CGGAAG	Klonierung von IIP-10 in pcDNA- flag
IIP-10-reverse	AGCTTGCGGCCGCGAATTCTTAAGTTG GTTCTTTTCCTC	Klonierung von IIP-10 in pcDNA- flag
p85α-sense	GGGAATGAAAATACCGAAG	DIG-markierte p85α-Sonde
p85α-reverse	GGGAGGTGTGTTGATAATGTAG	DIG-markierte p85α-Sonde
p85β-sense	CTGATGGAGGATGAGGACG	DIG-markierte p85β-Sonde
p85β-reverse	CTGCACAAGTGATGCGAGC	DIG-markierte p85β-Sonde
p55-sense	TGGTTTGTGAGGATATCAATC	DIG-markierte p55-Sonde
p55-reverse	CTGTGCATGAACAGGGTAG	DIG-markierte p55-Sonde
Grb10-sense	TATCCTAAGCAGCCAAAGCCC	DIG-markierte Grb10-Sonde
Grb10-reverse	AGCTGGATCAGATCGGAGAAC	DIG-markierte Grb10-Sonde
14-3-3-sense	CAGTCACAGAACAGGGGC	DIG-markierte 14-3-3-Sonde
14-3-3-reverse	ATCTCCTTTCATTTCAAGTAG	DIG-markierte 14-3-3-Sonde
s-IIP1-sense	ATGCCGCTGGGACTGGGG	DIG-markierte IIP-1-Sonde
s-IIP-1-reverse	CTAGTAGCGGCCGACCTTG	DIG-markierte IIP-1-Sonde
BTM116s	TCAGCAGAGCTTCACCATTG	5'-Sequenzierung von BTM116
M12	GAGCAGATGTTTACCGATGCCC	5'-Sequenzierung von VP16
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	3'-Sequenzierung von VP16
Oligo52	CGCGTTTGGAATCACTACAGGGATG	5'-Sequenzierung von pGAD1318
Oligo53	AGAATTGAGATGGTGCACGATGCAC	3'-Sequenzierung von pGAD1318

1.6. Plasmide und cDNS-Bibliotheken

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle	Zitat
BTM116	2-Hybrid-Köder-Vektor, der für die LexA-BD und den <i>TRP1</i> -Marker, dessen Expression Wachstum auf Trp-freiem Medium ermöglicht, kodiert	W. Birchmeier, MDC, Berlin	(Weidner et al., 1996)
BTM116-IR,-met,-ret,-ros,-kit,-fms	BTM116, der für zytopl. Domäne des IR, met, ret, ros, kit bzw. fms kodiert	W. Birchmeier, MDC, Berlin	(Weidner et al., 1996)

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle	Zitat
VP16	2-Hybrid-Fisch-Vektor, der für die VP16-AD und den <i>LEU2</i> -Marker, dessen Expression Wachstum auf Leu-freiem Medium ermöglicht, kodiert	W. Birchmeier, MDC, Berlin	(Weidner et al., 1996)
VP16-PDZ1, VP16-PDZ2	VP16, der für PDZ1 bzw. PDZ2 kodiert	W. Birchmeier, MDC, Berlin	
pGAD1318	2-Hybrid-Expressionsvektor, der für die Gal4-AD und den <i>LEU2</i> -Marker, dessen Expression Wachstum auf Leu-freiem Medium ermöglicht, kodiert	J. Camonis, Institut Curie, Paris, Frankreich	(Germani et al., 1999)
pGex5X1	bakterieller Expressionsvektor, der für die Glutathion-S-Transferase kodiert	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	
pRK5-1714	eukaryotischer Expressionsvektor, der für den wt hIGF-1R kodiert	A. Ullrich, MPI f. Biochemie, Martinsried	(Guo et al., 1995)
pRK5-1564	eukaryotischer Expressionsvektor, der für den hIGF-1R mit K/A-Mutation an Position 1033 kodiert	A. Ullrich, MPI f. Biochemie, Martinsried	(Guo et al., 1995)
pCMV-IR	eukaryotischer Expressionsvektor, der für den hIR kodiert	A. Ullrich, MPI f. Biochemie, Martinsried	(Kellerer et al., 1998)
pCR2.1	Klonierungsvektor	Invitrogen, Leek, Niederlande	
pcDNA3.1flag Neo	eukaryotischer Expressionsvektor mit Neomycin-Resistenz, der für den flag-Tag kodiert (MDYKDDDDKGRPQL)	W. Birchmeier, MDC, Berlin	(Weidner et al., 2000)
pcDNA3.1Hygro	eukaryotischer Expressionsvektor mit einer Hygromycinresistenz	Invitrogen, Leek, Niederlande	
pTre	eukaryotischer Expressionsvektor für das tet-on-System	Clontech, Heidelberg	

cDNS-Bibliothek	Beschreibung	Bezugsquelle	Zitat
Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek E10,5 in VP16	2-Hybrid-cDNS-Bibliothek, Insertgröße 0,3-0,7 kb, Anzahl unabhängiger Klone 5×10^6 , Inserts <i>NotI/NotI</i> kloniert	W. Birchmeier, MDC, Berlin	(Weidner et al., 1996)
Jurkat-cDNS-Bibliothek in pGAD1318	2-Hybrid-cDNS-Bibliothek, Insertgröße 1-2 kb, Anzahl unabhängiger Klone $1-2 \times 10^6$, Inserts <i>EcoRI/NotI</i> kloniert	J. Camonis, Institut Curie, Paris, Frankreich	(Germani et al., 1999)

1.7. Antikörper

Antikörper	Verwendung/Verdünnung	Bezugsquelle
anti-IGF-1R-Antikörper, β -Untereinheit (C-20)	Western-Blot (0,2 μ g/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-IGF-1R-Antikörper, α -Untereinheit (Ab-1)	Immunfluoreszenz (2 μ g/ml)	Oncogene, Cambridge, USA
anti-IR-Antikörper, β -Untereinheit (C19)	Western-Blot (0,2 μ g/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10)	Western-Blot, Hefe-Kolonieblot (1 μ g/ml)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
anti-flag-Antikörper (M2)	Western-Blot (2 μ g/ml), Immunfluoreszenz (10 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-flag-Agarose	Immunpräzipitation	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-MAPK-active	Western-Blot (1:500)	Promega, Madison, USA

Antikörper	Verwendung/Verdünnung	Bezugsquelle
anti-MAPK	Western-Blot (1:500)	Promega, Madison, USA
anti-DIG-AP, Fab-Fragmente	Northern-Blot, Southern-Blot (1:500)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
anti-Kaninchen IgG-POD	Western-Blot (0,4 µg/ml)	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG-POD	Western-Blot (0,4 µg/ml)	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG-Cy2	Immunfluoreszenz (1,5 µg/ml)	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG-Cy3	Immunfluoreszenz (1,5 µg/ml)	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG-Cy2	Immunfluoreszenz (1,5 µg/ml)	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG-Cy3	Immunfluoreszenz (1,5 µg/ml)	Dianova, Hamburg

1.8. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung
DH5α	<i>F endA1 recA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Klonierung, Plasmid-Amplifikation
HB101	<i>F Δ(gpt-ptoA)62 leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 Δ(mcrC-mrr)rpsL20(Str^I)xyl-5 mtl-1 recA13</i>	Elektroporation, Plasmid-Amplifikation
BL21	<i>F ompT gal[dcm][lon] hsdS_B(r_b⁻, m_b⁻)</i>	Proteinexpression

1.9. Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung (1 Liter)
LB (Luria Broth) Platten:	10 g Bacto-Trypton (1 %) 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (0,5 %) 5 g NaCl, (0,5 %) pH 7,4; bei Bedarf Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin + 15 g Bacto-Agar
SOC	20 g Bacto-Trypton (2 %) 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (0,5 %) 0,584 g NaCl (10 mM) 0,186 g KCl (2,5 mM) 2,03 g MgCl ₂ · 6H ₂ O (10 mM) 2,46 g MgSO ₄ · 7H ₂ O (10 mM) 20 ml 1M Glukose (20 mM)
5xM9-Salze	42,51 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 2,5 g NaCl 15 g KH ₂ PO ₄ 5 g NH ₄ Cl
M9/-Leu-Minimalmedium Platten:	100 ml Hefe-Leu-Medium (siehe 1.11.) 200 ml 5xM9-Salze 4 ml 10mg/ml Prolin 1 ml 1M Thiamin 10 ml 40% Glukose 0,5 ml 100 mg/ml Ampicillin + 15 g Bacto-Agar

LB- und SOC-Medium und 5xM9-Salze wurden für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert; Glukose-, Prolin- und Thiaminlösungen wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklaviervorgang hinzugefügt.

1.10. Hefestämme

Für die 2-Hybrid-Experimente wurde der *S.cerevisiae* Stamm L40 verwendet, der als Reportergene lacZ und HIS3 genomisch vor der UAS-Sequenz ('upstream activating sequence') für die LexA-DNS-Bindungsdomäne integriert hat. Auf Interaktion von Köder- und Fisch-Protein kann somit in His-freiem Medium (Wachstum) oder durch Zugabe von Xgal (Blaufärbung) oder ONPG (Gelbfärbung) selektioniert werden. Außerdem sind die Gene *TRP1* und *LEU2* in dem Hefestamm L40 ausgeschaltet, so daß eine erfolgreiche Transfektion mit dem Köder-Vektor BTM116 und/oder den Fisch-Vektoren VP16 bzw. pGAD1318 durch Wachstum in Trp- und/oder Leu-freiem Medium angezeigt wird.

Der Genotyp von L40 sieht wie folgt aus:

MATahis3D200trp1-901leu2-3,-112ade2LYS::(*lexAop*)₄-*HIS3*, URA3(*lexAop*)₈-lacZgal4

1.11. Hefemedien

1.11.1. ‘10xAminosäure-Dropout-Lösungen‘

Aminosäuren \ Dropout-Lsg.	-THULL	-TL	-T	-L
L-Isoleucin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l
Adenin Hemisulfat-Salz	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Arginin HCl	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat		200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Leucin			1000 mg/l	
L-Lysin HCl		300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l
L-Tryptophan				200 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
Uracil		200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l

Die ‘10x Dropout-Lösungen‘ wurden für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

1.11.2. Medien

Medium	Zusammensetzung (1 Liter)
YPD	20 g Bacto-Pepton 10 g Hefe-Extrakt 50 ml 40 % Glukose
Platten:	+ 15 g Bacto-Agar
10xSD-Medium	67 g ‘Nitrogen base without amino acids’, pH 5,8
Minimalmedien	100 ml 10xSD-Medium 100 ml 10xAminosäure-Dropout-Lösung 50 ml 40 % Glukose
Platten:	+ 15 g Bacto-Agar

YPD- und 10xSD-Medium wurden für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert; Die Glukoselösung wurde sterilfiltriert und nach dem Autoklaviervorgang hinzugefügt.

1.12. Zellen und Zelllinien

Zelllinie/ Zelltyp	Bezugsquelle	Medium
NIH3T3-I24	A. Ullrich, MPI f. Biochemie, Martinsried	DMEM, 10 % FCS, 10 mM L-Glu, 0,4 mg/ml G418
HEK 293	R. Schumacher, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10% FCS, 10 mM L-Glu
MCF-7	K. M. Weidner, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10% FCS, 10 mM L-Glu
tet-MCF-7	M. Kubbies, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10 % FCS, 10 mM L-Glu, 0,5 mg/ml G418
G361	K. M. Weidner, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10% FCS, 10 mM L-Glu
SW480	K. M. Weidner, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10% FCS, 10 mM L-Glu
MOLT-3	M. Kubbies, Roche Pharma, Penzberg	RPMI1416, 10% FCS, 10 mM L-Glu
Daudi	M. Kubbies, Roche Pharma, Penzberg	RPMI1416, 10% FCS, 10 mM L-Glu
HL-60	M. Kubbies, Roche Pharma, Penzberg	RPMI1416, 10% FCS, 10 mM L-Glu
HUVEC	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	RPMI1416, 10% FCS, 10 mM L-Glu
HMEC	U. Weidle, Roche Pharma, Penzberg	MEGM
SAEC	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	SAGM

Zelllinie/ Zelltyp	Bezugsquelle	Medium
humane Keratinozyten (Vorhaut)	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	Definiertes Keratinozyten Medium
humane Fibroblasten (Vorhaut)	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	DMEM, 10% FCS, 10 mM L-Glu

1.13. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

Name	Bezugsquelle
MEGM	BioWhittaker, Walkersville, USA
SAGM	Gibco, Eggenstein
Zell-Dissoziationspuffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Definiertes Keratinozyten Medium	Gibco, Eggenstein
FKS	Hyclone, Logan, USA
FKS, Tetracyclin-frei	Clontech, USA
MTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Doxycyclin	Clontech, USA

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

Alle grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden entweder wie in (Sambrook et al., 1989) oder unter Verwendung der oben aufgeführten 'Kits' durchgeführt.

2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die meisten Klonierungen wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde die DNS-Polymerase *Pwo* verwendet, da dieses Enzym durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität geringere Mutationsraten aufweist als die *Taq*-Polymerase. In einem 50 µl-Ansatz wurden je 20 pmol der entsprechenden Oligonukleotide und 100 ng 'Template' eingesetzt und laut Herstellerangaben DNS-Polymerase und Desoxynukleotide zugesetzt.

Die PCR-Methode wurde ebenfalls verwendet, um für Northern Blot- und Southern Blot-Analysen DIG-markierte Sonden herzustellen. Dazu wurde der 'PCR DIG Synthesis Kit' angewendet und die Reaktionen laut Vorschrift durchgeführt.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem 'Gene Amp PCR System 9600-Gerät' durchgeführt.

2.1.2. RT-PCR

Um die volle Länge cDNS von IIP-1 zu klonieren, wurde eine RT-PCR-Reaktion unter Verwendung des 'Titan One Tube RT-PCR Systems' durchgeführt. Mit diesem System ist eine Ein-Schritt-RT-PCR möglich, bei der cDNS-Synthese und PCR zwar nacheinander aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien erfolgen kann. Für die Erststrang-Synthese wird die reverse Transkriptase des AMV-Virus (avian myeloblastosis virus) und für den PCR-Teil der Reaktion eine Mischung aus *Taq* und *Pwo*-Polymerase verwendet. Die Durchführung der RT-PCR-Reaktion erfolgte laut Hersteller unter Verwendung von 100 ng Gesamt-RNS aus MCF-7 Zellen.

Die RT-PCR-Reaktion wurde in einem 'Gene Amp PCR System 9600-Gerät' durchgeführt.

2.1.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte nach der Dideoxynukleotid-Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Dideoxynukleotide. Ein 20 µl-Sequenzierungsansatz enthielt 500 ng Plasmid-DNS bzw. 100 ng PCR-Fragment, 10 pmol Sequenzier-Oligonukleotid und 4 µl BigDye Terminator RR-Mix. Eine 'Cycle-Sequencing'-PCR-Reaktion wurde anschließend in einem 'Gene Amp PCR System 9600-Gerät' durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz wurde unter Verwendung des 'DyeEx Spin Kit' aufgereinigt. 5 µl des Eluats wurden in einem Kapillarsequenziergerät analysiert.

2.1.4. Isolierung von Gesamt-RNS

Die Isolierung von Gesamt-RNS erfolgte nach dem von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Ein-Schritt-Verfahren unter Verwendung von 'Tripure' (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Adhärenz wachsende Zellen wurden direkt in den Zellkulturflaschen lysiert. Die anschließende RNS-Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der Konzentration der in DEPC-H₂O gelösten RNS wurde in einem Spektrophotometer die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und aus dem Quotienten $A_{260/280}$ der Reinheitsgrad berechnet.

2.1.5. Northern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden

Ein bereits fertiger 'Multiple Tissue Northern Blot', auf dem jeweils 1 µg PolyA⁺-RNS des entsprechenden Gewebes aufgetragen war, bzw. ein bereits fertiger 'Multiple Tissue Expression Array', auf dem jedes der 76 Felder 58-760 ng polyA⁺-RNS enthält, wurden von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen. Beide Blots wurden mit einer IIP-1-spezifischen DIG-markierten Sonde

analysiert. Dazu wurden die Blots zunächst für 1 h bei 50°C in 'DIG Easy Hyb' prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert und sofort in frische Hybridisierungslösung gegeben (0,25 ng/ml DIG Easy Hyb). Die Membran wurde in dieser Lösung 1 h bei 50°C inkubiert. Der Blot wurde anschließend zweimal 5 min mit 2xSSC, 0,1 % SDS bei RT und zweimal 15 min mit 0,1xSSC, 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte zur Detektion der DIG-markierten Sonden erfolgte wie vom Hersteller für das 'DIG Wash and Block BufferSet' beschrieben. Als Substrat diente CDP-Star, welches durch die an die DIG-spezifischen Antikörper konjugierte Alkalische Phosphatase in ein chemilumineszentes Produkt umgesetzt wird. Um einen Northern Blot erneut hybridisieren zu können, wurde die DNS-Sonde bei 95°C für 10 min in 0,1xSSC vom Blot gewaschen. Der MTN-Blot wurde beispielsweise nach diesem 'Stripping-Prozess' mit einer DIG-markierten Aktin-RNS-Sonde (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) analysiert.

2.1.6. Southern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden

Zur Analyse der im Rahmen der '2-Hybrid-Screens' isolierten cDNAs wurden die unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion amplifizierten 'Inserts' mittels Elektrophorese in einem 1 % TAE-Agarosegel aufgetrennt. Es folgte ein Kapillartransfer mit 0,4 M NaOH wie beschrieben (Sambrook et al., 1989) auf eine positiv geladene Nylonmembran mit anschließender UV-Quervernetzung der DNS-Moleküle. Der Blot wurde analog zum Northern Blot in 'DIG Easy Hyb' mit 15 ng DIG-markierter Sonde (p85 α , p85 β , p55, Grb10, 14-3-3, IIP-1) pro ml bei 42°C 1 h hybridisiert. Die Waschschrte und die Detektion wurden anschließend ebenfalls wie unter 2.1.5. beschrieben durchgeführt.

2.2. Proteinchemische Methoden

2.2.1. Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in Bakterien

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen (IIP-1, p85) wurde der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende pGex5X1-Vektor in den Bakterienstamm BL21 transformiert. Anschließend wurde eine 10⁶ CFU-Kultur mit einer transformierten Kolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurde die 10⁶ CFU-Kultur 1:100 verdünnt und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,9 erfolgte die Induktion der Expression der Fusionsproteine mit 0,1 mM IPTG für 3 h bei 30°C. Das nach einem Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min) entstandene Bakterienpellet wurde in 50 μ l PBS pro 1 ml Kultur resuspendiert und anschließend sonifiziert. Durch Zugabe von 1/100 VT Triton-X-100 wurden die Proteine bei 4°C für 30 min solubilisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20 000 x g, 10 min, Tischzentrifuge) befanden sich die Fusionsproteine im Überstand.

Um die GST-Fusionsproteine aufzureinigen, wurde das Sonikat mit 50 %iger gewaschener Glutathion-Sepharose (2 ml pro 100 ml Sonikat) versetzt und für 30 min bei RT unter gemäßigttem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Fusionsproteine entweder mit 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM Tris/HCl (1 ml pro 1 ml Bettvolumen) eluiert oder direkt in 'GST-Pulldown-Assays' eingesetzt.

2.2.2. Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Um aus Säugetierzellen Lysate zu gewinnen, wurden die entsprechenden Zellen in '10 cm-Schalen' ausgesät und bis zu einer 80 %igen Konfluenz wachsen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS erfolgte die Lyse des Zellrasens mit 200 μ l Lysispuffer.

Lysispuffer: 50 mM HEPES, pH 7,5
150 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
1 mM EDTA
10 % Glycerol
1 % Triton-X-100

1 mM Na₃VO₄ (Phosphatase-Inhibitor)
 1 Tablette Complete Mini pro 10 ml Puffer (Protease-Inhibitor-Mix, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu einer vollständigen Lyse der Zellen wurden die Zellsuspensionen 15 min unter gemäßigttem Schütteln bei 4°C inkubiert und anschließend unlösliche Fragmente in einem Zentrifugationsschritt (20 000 x g, 10 min, Tischzentrifuge) abgetrennt.

2.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes von Zellysaten

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Lysaten erfolgte nach der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Diese photometrische Konzentrationsbestimmung wurde unter Verwendung des 'Protein Assay Dye Reagent' nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4. Herstellung und Aufreinigung eines Antiserums

Zur Herstellung eines polyklonalen anti-IIP-1-Antiserums wurden Kaninchen mit aufgereinigtem GST-IIP-1 (siehe 2.2.1.) immunisiert (W. Rollinger, Roche Diagnostics, Penzberg). Nachdem sich das Antiserum in 'ELISA'-Analysen als spezifisch herausgestellt hatte, wurde es weiter aufgereinigt. Zunächst wurde das Serum durch Zusatz von 15 g/l Aerosil 1 h bei RT delipidiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde durch Zugabe von 252,5 g Ammoniumsulfat pro l Serum 2 h bei RT gefällt (pH-Einstellung auf 7,0 erfolgte mit 2N Ammoniak). Der Protein-Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 200 ml (pro l Serum) Dialysepuffer (15 mM KPO₄, 50 mM NaCl, pH 7,0) gelöst und gegen 4 x 10 l Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Um die IgGs aus dieser Proteinlösung zu gewinnen, wurde ein Chromatographie-Schritt unter Verwendung eines Anionenaustauschers (DEAE Sepharose fast flow) durchgeführt. Pro l Antiserum als Ausgangsmaterial wurde eine Säule mit 500 ml DEAE Sepharose gepackt. Die DEAE-Sepharose wurde mit Dialysepuffer äquilibriert und vor dem Packen entgast. Die aus dem Dialyse-Schritt resultierende Proteinlösung wurde nochmals abzentrifugiert und der Überstand auf die Säule mit einem Fluß von ca. 1 SV/10h aufgetragen. Die Elution erfolgte bei gleichem Fluß mit Dialysepuffer unter Fraktionierung des Ablaufs. Das IgG erschien weitgehend unverzüglich im Durchlauf. Die Fraktionen wurden gemäß UV-Schreiberprofil gepoolt (beginnend mit dem Proteindurchbruch bis zu den Fraktionen, bei denen die Absorption auf 50 % der max. Absorption abgesunken war). Die Proteinkonzentration dieser IgG-Lösung betrug 8 mg/ml. Die aufgereinigten IgGs wurden zu der spezifischen Detektion von IIP-1 in Immunoblot-Analysen in einer Verdünnung von 1:100 und in Immunfluoreszenzuntersuchungen in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

2.2.5. Immunoblot-Analyse

Die zu analysierenden Proteingemische wurden zunächst in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurden 7,5 %ige und 12 %ige Tris/HCl-Fertiggele verwendet. Die Proben wurden mit 4 VT SDS-Auftragspuffer (250 mM Tris pH 6,8, 500 mM Dithiothreitol, 10 % SDS, 50 % Glycerol) versetzt, denaturiert (10 min bei 90 °C) und auf das entsprechende Tris/HCl-Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der 'Rainbow coloured protein Marker'. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V in 1 x Lämmli-Puffer.

Lämmli-Puffer: 0,025 M Tris
 0,192 M Glycin
 0,1 % SDS (w/v) pH 8,4

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit einer Coomassie-Lösung angefärbt oder mittels der 'Semidry-Blotting-Methode' unter Verwendung von Transferpuffer auf eine PVDF-Membran übertragen, um mit spezifischen Antikörpern analysiert werden zu können

Transferpuffer: 0,039 M Glycin

0,048 M Tris

0,037 % SDS (w/v)

20 % Methanol (v/v)

PBST: PBS, 0,1 % Tween-20

Die Membran wurde üN unter Verwendung von 5 % Magermilch (in PBST) blockiert, anschließend 1 h mit dem entsprechenden Erstantikörper (in 5 % BSA in PBST) inkubiert und nach dreimaligem Waschen für je 10 min in PBST mit dem POD-konjugierten Zweitantikörper (in 5 % BSA in PBST) für 1 h inkubiert. Der Blot wurde dreimal für je 10 min in PBST gewaschen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem ECL-Reagenz unter Erzeugung eines chemilumineszenten Signals detektiert. In einigen Fällen wurden die Antikörper anschließend durch Inkubation in 62,5 mM Tris (pH 6,8), 2 % SDS und 100 mM β -Mercaptoethanol für 45 min bei 50 °C abgewaschen.

2.2.6. Ko-Immunpräzipitation aus Zellysaten

Um Komplexe aus flag-Fusionsproteinen und dem IGF-1 R oder dem IR aus eukaryotischen Zellen zu isolieren, wurden 750 μ g Gesamtprotein aus HEK 293 Zellen, die mit den entsprechenden eukaryotischen Expressionsvektoren transfektiert waren, in einem Immunpräzipitationsexperiment eingesetzt (Lammers et al., 1989). Nachdem das Volumen der Ansätze mit Lysispuffer auf 200 μ l angeglichen worden war, wurde 1 VT HNTG-Puffer hinzugesetzt.

HNTG-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,5

150 mM NaCl

10 % Glycerol

0,1 % Triton-X-100

1 mM Na_3VO_4

Anschließend wurden die Proteinkomplexe nach der Zugabe von 50 μ l anti-flag M2-Agarose (50 % in PBS) üN bei 4°C immunpräzipitiert. Nach dreimaligem Waschen mit HNTG-Puffer wurde die flag-Agarose in 25 μ l 1xSDS-Auftragspuffer (siehe 2.2.5.) aufgenommen, erhitzt und in Immunoblots analysiert.

2.2.7. ‘GST-Pulldown-Assay‘

GST-Fusionsproteine (IIP-1, p85) wurden in dem Bakterienstamm BL21 unter Verwendung von 100 ml Ausgangskultur exprimiert und anschließend mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt (siehe 2.2.1.). Mit den an die Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteinen wurde dann der IGF-1 Rezeptor aus I24-Zellysaten präzipitiert. Je 1×10^6 I24-Zellen wurden dazu vor der Lyse entweder 24 h in serumfreiem Medium (0,5 % dialysiertes FKS) inkubiert oder zusätzlich für 10 min mit 10^{-8} M IGF-1 behandelt. Zu den Lysaten wurden 5 μ g GST-Fusionsproteine (adsorbiert an 80 μ l 50 %ige Glutathion-Sepharose) gegeben und üN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml Lysispuffer wurden die gebundenen Proteine in 25 μ l 1xSDS-Auftragspuffer solubilisiert und in Immunoblots analysiert.

2.3. Hefe-2-Hybrid-System

Das in dieser Arbeit verwendete 2-Hybrid-System umfaßt den Köder-Vektor BTM116 und den Fisch-Vektor VP16 bzw pGAD1318 (siehe 1.6.) sowie den *S. cerevisiae* Stamm L40 (siehe 1.10.). Nach Transfektion von Köder- und Fisch-Vektor in L40 kann auf Expression und Interaktion der Fusionsproteine folgendermaßen selektioniert werden:

- (1) Selektion auf Expression des Köder-Proteins:
Trp-freies Medium (-T-Medium)
- (2) Selektion auf Expression des Fisch-Proteins
Leu-freies Medium (-L-Medium)

(3) Selektion auf Interaktion von Köder- und Fisch-Protein

His-, Trp, Leu, Ura, Lys-freies Medium (-THULL)

Durch Zugabe von 3-Aminotriazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor des HIS3-Genproduktes, kann die Stringenz der Interaktion erhöht werden (siehe). Daher wurde teilweise dem Selektionsmedium 3-AT in Konzentrationen von 5 mM bis 25 mM zugesetzt.

2.3.1. Untersuchung definierter Interaktionen im 2-Hybrid-System

Benötigte Lösungen:

10xLiAc (1 M LiAc)

10xTE (100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8)

50 % PEG 4000

Die Lösungen wurden bei 121°C und 2 bar autoklaviert und erst kurz vor Gebrauch wie unten angegeben verdünnt.

Um eine Interaktion zwischen zwei definierten Proteinen im 2-Hybrid-System zu untersuchen, wurde eine sequentielle Transfektion von L40 Hefen zuerst mit dem Köder-Vektor und anschließend mit dem Fisch-Vektor durchgeführt. Für die Transfektion der Plasmide in Hefe wurde die Lithium-Acetat-Methode gewählt.

Bei dem ersten Transfektionsschritt wurde zunächst eine üN-Kultur von L40-Hefen (25 ml YPD) angesetzt, mit der am darauffolgenden Tag 150 ml YPD-Medium inokuliert wurden (OD_{600} 0,2). Diese Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 1000 x g für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet mit 25 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 750 µl 1xTE/1xLiAc resuspendiert. 50 µl dieser kompetenten Zellen wurden jeweils in einem Transfektionsansatz eingesetzt. Für die Transfektion wurden 1 µl (ca. 100 ng) des entsprechenden Köder-Vektors mit 5 µl Lachssperma-DNS ('Carrier-Funktion') und 50 µl kompetenter Zellen gemischt und anschließend 300 µl einer PEG-LiAc-Lösung (1xLiAc, 1xTE, 40% PEG) hinzugefügt. Diese Zellsuspension wurde auf einem Vortex-Gerät gut gemischt und dann bei 30°C für 30 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 35 µl DMSO pro Ansatz erfolgte ein Hitzeschock von 15 min bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt und durch eine Zentrifugation bei 20 000 x g für 5 sek (Tischzentrifuge) geerntet. Das Zellpellet wurde in 250 µl H₂O resuspendiert. 40-80 µl dieser Zellsuspension wurden auf -T-Medium ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen bei 30°C waren erste Hefekolonien zu beobachten.

Für den zweiten Transfektionsschritt, in dem der Fisch-Vektor in die das Köder-Protein exprimierenden Hefen transfektiert werden sollte, wurde eine Kolonie der entsprechenden Hefen verwendet. Diese wurde in -T-Medium expandiert und die Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Die resultierenden Doppeltransfektanten wurden zur Transfektionskontrolle auf -TL-Medium und zur Untersuchung der Interaktion auf -THULL-Medium ausgestrichen.

2.3.2. '2-Hybrid-Screening' von cDNS-Bibliotheken

Benötigte Lösungen: siehe 2.3.1.

Die Transfektion von 2-Hybrid-cDNS-Bibliotheken erfolgte ebenfalls nach der Lithium-Acetat Methode in L40 Hefen, die bereits mit dem entsprechenden Köder-Vektor transfektiert waren.

Zunächst wurde eine 5 ml üN-Kultur von L40 Hefen, die das entsprechende Köder-Protein exprimierten, in -T-Medium angezogen, die am darauffolgenden Tag in 200 ml -T-Medium überführt wurde. Diese Kultur wurde wiederum üN bei 30°C wachsen gelassen. Dann wurden 500 ml YPD-Medium mit dieser üN-Kultur inokuliert, so daß eine OD_{600} von 0,2 entstand. Anschließend wurden die Hefen bei 30°C solange inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} von 0,5-0,6 aufwies und dann mit 500 ml H₂O gewaschen (Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1000 x g für 5 min). Das resultierende Zellpellet wurde in 20 ml 1xLiAc/1xTE aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 450 µg Plasmid der cDNS-Bibliothek und 2,5 ml Lachssperma-DNS (2,5 mg/ml) wurden 140 ml einer PEG-LiAc-Lösung (1xLiAc, 1xTE, 40% PEG) hinzugefügt, gemischt und die Zellsuspension für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte nach der Zugabe von 17,6 ml DMSO ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt

und durch einen Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde wie oben gewaschen und in 1 l YPD resuspendiert. Diese Kultur wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 l –TL-Medium resuspendiert und die Kultur für 8 h bei 30°C inkubiert. Um die primäre Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurden vor dem Inkubationsschritt $1/10^4$ VT der Kultur auf eine –TL-Platte ausgestrichen. Die Gesamtzahl an Transfektanten sollte der Anzahl unabhängiger Klone entsprechen. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Transfektanten zweimal wie oben gewaschen und zum Schluß in 10 ml H₂O aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 500 µl-, 250 µl-, 100 µl- und 50 µl-Aliquots auf –THULL-Platten ausgestrichen. Um die Anzahl der redundanten Kolonien, die durch den 8 h-Amplifikationsschritt entstanden, zu bestimmen, wurden außerdem $1/10^5$ und $1/10^6$ des Ansatzes auf –TL-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Platten für 4-5 Tage bei 30°C konnten erste Kolonien geerntet und weiter analysiert werden.

2.3.3. PCR auf Hefekolonien

Die in einem ‘2-Hybrid-Screen‘ auf –THULL-Platten gewachsenen Kolonien enthalten Fisch-Vektoren, die für potentielle Interaktionspartner des verwendeten Köder-Proteins kodieren. Um die cDNS-Sequenz dieser Interaktionspartner analysieren zu können, wurde zunächst das entsprechende ‘Insert‘ des Fisch-Vektors in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden dann entweder mittels Southern Blot-Analyse (siehe 2.1.6.) oder durch Sequenzierung (siehe 2.3.4.) analysiert.

Hefekolonien wurden von einer –THULL-Platte gepickt und in 20 µl 0,02 N NaOH resuspendiert. Um die Hefezellen zu lysieren, wurde 1 Spatelspitze ‘Acid Washed Glass Beads‘ hinzugefügt, die Lösung auf einem Vortex-Gerät gemischt und anschließend bei 100°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer pelletiert und 8 µl des Überstandes in einer Standard-PCR-Reaktion eingesetzt. Die Effizienz der Reaktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.3.4. Sequenzierung von Hefe-PCR-Produkten

Um die aus der Kolonie-PCR resultierenden Fragmente sequenzieren zu können, erfolgte zunächst eine Degradation von Oligonukleotiden und dNTPs, die in dem PCR-Ansatz (siehe 2.3.3.) noch vorhanden waren. Dazu wurden 6 µl der PCR-Reaktion mit 10 U Exonuklease I und 1 U Alkalischer Phosphatase für 15 min bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die Enzyme bei 80°C für 15 min inaktiviert. Dieser Ansatz konnte dann in einer Sequenzierreaktion, wie in 2.1.3. beschrieben, eingesetzt werden.

2.3.5. Präparation von Plasmid-DNS aus Hefen

Um Fisch-Plasmid-DNS aus Hefen zu isolieren, muß zunächst aus den entsprechenden Hefen DNS extrahiert werden. Diese DNS wird anschließend mittels Elektroporation in den Bakterienstamm HB101 transformiert. Da dieser Stamm eine Mutation im *LEU2*-Gen enthält, kann unter Verwendung von Leu-freiem Medium auf erfolgreiche Transformation selektioniert werden.

Die Hefe-DNS wurde aus 1,5 ml einer entsprechenden üN-Kultur isoliert. Dazu wurden die Hefezellen zuerst pelletiert und in 200 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert.

Hefe-Lysispuffer:	100 mM Tris	
	10 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
	2 % Triton-X-100	
	1 % SDS (w/v)	pH 8,0

Nach der Zugabe von 300 mg ‘Acid Washed Glass Beads‘ und 200 µl P/C/I-Lösung wurde die Suspension für 2 min auf einem Vortexgerät gemischt und anschließend für 5 min bei 20 000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 2,5 VT Ethanol und $1/10$ VT 3M Na-Acetat gefällt und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das resultierende DNS-Pellet wurde in 20 µl H₂O resuspendiert.

1 µl dieser DNS-Lösung wurde in elektrokompente HB101-Bakterien transformiert. Dazu wurden Hefe-DNS und 40 µl elektrokompente Zellen gemischt und eine Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω in 0,2 cm Küvetten durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1xM9-Salzen wurden die transformierten Bakterien auf M9/-L-Medium ausgestrichen. Nach 1-2 Tagen bei 37°C gewachsene Kolonien wurden gepickt. Mittels Standardmethoden konnten dann aus diesen Bakterien die entsprechenden Fisch-Vektoren isoliert werden.

2.3.6. 'b-Galaktosidase-Assay'

Für quantitative Analysen von Interaktionen wurde das lacZ-Reportergen verwendet. Die entsprechenden Hefen wurden in 5 ml –TL-Medium bis zur stationären Phase kultiviert, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und weitere 3-4 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die exakte OD₆₀₀ wurde gemessen. 1 ml der Kultur wurde pelletiert und einmal mit H₂O gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde in 200 µl Z-Puffer resuspendiert.

Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄·7H₂O
 40 mM NaH₂PO₄·2H₂O
 10 mM KCl
 10 mM MgSO₄·7H₂O pH 7,0

100 µl des Ansatzes wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und die Zellen durch wiederholte Einfrier-Auftau-Vorgänge aufgebrochen. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 700 µl Z-Puffer/50 mM β-Mercaptoethanol. Die Farbreaktion wurde mit 160 µl Z-Puffer, dem 4 mg/ml ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) zugesetzt waren, gestartet. Nach einer gelben Farbentwicklung bzw. nach 45 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 400 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Zelltrümmer wurden anschließend durch eine Zentrifugation bei 20 000 x g für 10 min abgetrennt. Die OD₄₂₀ des Überstandes wurde gemessen und die β-Galaktosidase-Aktivität folgendermaßen berechnet:

$$\beta\text{-Gal-Units} = 1000 [\text{OD}_{420}/t \times V \times \text{OD}_{600}]$$

t = Zeit in Minuten bis zur Farbentwicklung

V = Volumen in ml an Kultur, die zu Z-Puffer (+ β-Mercaptoethanol) hinzugegeben wurde

2.3.7. Hefekolonieblot

Um die Tyrosinphosphorylierung von LexA-Köder-Proteinen in Hefekolonien zu detektieren, wurde ein Hefekolonieblot nach Lyons und Nelson durchgeführt (Lyons und Nelson, 1984).

Eine Nitrozellulose-Membran wurde zunächst auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsmedium gelegt. Auf diese Nitrozellulose-Membran wurden anschließend die jeweiligen Hefen ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen bei 30°C wurden die Hefekolonien auf dem Nitrozellulosefilter lysiert. Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran auf einen mit Lysispuffer getränkten 'Whatman-Filter' überführt und 30 min bei RT inkubiert.

Lysispuffer: 0,2 M NaOH
 0,1 % SDS
 0,5 % β-Mercaptoethanol.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die lysierten Hefen mit H₂O abgewaschen. Anschließend wurden die an die Nitrozellulose-Membran adsorbierten Hefe-Proteine auf Phosphorylierung an Tyrosinresten mittels Immunoblot untersucht.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Zellkulturführung

Alle Zellen und Zelllinien wurden in den unter 1.12. angegebenen Medien bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hatten die adhärennten Zellen einen etwa zu 80 % konfluenten Zellrasen gebildet, wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (FKS, 10 % DMSO) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Styroporbehälter bei -80°C eingefroren. Danach wurden die Zellen in einem Stickstofftank gelagert.

2.4.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels FuGene

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Transfektionsmethode mit dem FuGene-Transfektionsreagenz liegt das Prinzip der Lipofektion zugrunde.

Für Immunpräzipitationsexperimente wurden 5×10^6 HEK 293 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit je 5 µg an eukaryotischen Expressionsplasmiden, die für die zu untersuchenden Plasmide kodierten, transfektiert. Dazu wurde die DNS zunächst mit 20 µl FuGene und 80 µl serumfreien Medium gemischt.

Für Immunfluoreszenzstudien wurden 1×10^5 Zellen (MCF-7, I24) in eine Kammer eines Objektträgers mit 4 Vertiefungen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNS transfektiert. Entsprechend der geringeren Zellzahl und der geringeren Plasmidmenge wurde die DNS mit 2 µl FuGene und 98 µl serumfreien Medium gemischt.

Die Suspension aus DNS, FuGene und serumfreien Medium wurde in beiden Fällen für 15 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf den Zellrasen pipettiert.

2.4.3. Herstellung stabil transfizierter MCF-7-tet-on-Klone

Zur Herstellung stabil transfizierter MCF-7 tet-on-Klone, die IIP-1 unter der Kontrolle eines durch Tetracyclin-induzierbaren Promoters exprimieren, wurden MCF-7 Zellen verwendet, die bereits den reversen Tet-Repressor stabil exprimierten (tet-MCF-7). 3×10^6 tet-MCF-7 Zellen wurden mit 10 µg pTre-IIP-1 und 1 µg pcDNA3.1Hygro (als Resistenzplasmid) mittels der FuGene-Methode transfektiert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen aus der 10 cm-Schale gelöst und in verschiedenen Verdünnungen in neue 10 cm-Schalen überführt. Nach einem weiteren Tag wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Das Medium wurde dann zum Entfernen abgestorbener Zellen regelmäßig gewechselt. Waren nach etwa zwei bis drei Wochen gut gewachsene Einzelkolonien zu sehen, wurden diese mit Hilfe von Klonierungszylindern vereinzelt. Dazu wurden die Zellen auf den Schalen vorsichtig mit PBS gewaschen. Über einzelne Klone wurden dann die Zylinder gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Tropfen Trypsin/EDTA abgelöst und in eine 48-Lochplatte transferiert.

2.4.4. Immunfluoreszenz-Analysen

Je 1×10^5 transfektierte MCF-7 bzw. I24 Zellen (siehe 2.4.2.), die in Objektträger mit vier aufgesetzten Kammern ausgesät worden waren, wurden 24 h nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 4 % Paraformaldehyd / 4 % Sucrose (in PBS) für 25 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend mit Blockierungslösung (17,6 % FKS, 0,3 % Triton-X-100 in PBS) gleichzeitig blockiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen mit dem Erstantikörper (in Blockierungslösung) für 2 h inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Zweitantikörpern, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2 (grünes Signal) bzw. Cy3 (rotes Signal) gekoppelt waren. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Bei Bedarf wurden die Zellkerne mit DAPI-Lösung (1 µg/ml in PBS) für 5 min gefärbt und noch einmal mit PBS gewaschen. Der Objektträger wurde anschließend unter Verwendung von 70 % igem Glycerol eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop, wobei Cy2-Signale bei einer Absorptions-/Emissionswellenlänge von 492nm/520nm und Cy3-Signale bei einer Absorptions-/Emissionswellenlänge von 550nm/570nm analysiert wurden. Die Signale wurden mit einer 3-CCD-Farbvideokamera aufgenommen.

2.4.5. Proliferationstest

Um die IGF-1-abhängige Proliferation zu untersuchen, wurden stabile MCF-7-Transfektanten (siehe 2.4.3) mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/Loch in eine 96-Loch-Platte mit bzw. ohne Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) ausgesät. In Anwesenheit von Doxycyclin wird IIP-1 exprimiert. Nach 24 h wurde das Medium gegen serumfreies Medium, das 0,1 % dialysiertes FKS enthielt, ausgetauscht und die Zellen für 24 h synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h in serumfreiem Medium (0,1 % FKS, dialysiert) in An- bzw. Abwesenheit von 10^{-8} M IGF-1 kultiviert. Die Zellzahl wurde indirekt durch einen WST-1-Test bestimmt. Von den Zellen wird bei diesem Test das Farbsubstrat WST-1, ein Tetrazolium-Salz, durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein lösliches Formazanderivat umgesetzt, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 600 nm) korreliert zu der Enzymaktivität und damit zu der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen.

Die Durchführung des Testes erfolgte wie vom Hersteller beschrieben.

2.4.6. Transwell-Migrationstest

Die Migrationsexperimente wurden unter Verwendung der stabilen MCF-7-Transfektanten in 'Transwell-Kammern', wie von Manes et al beschrieben, durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten 'Transwell-Kammern' (Costar, Cambridge, USA) bestanden aus einer 12-Loch-Zellkulturplatte und Filtereinsätzen, die eine Porengröße von 12 µm aufwiesen.

Die Expression von IIP-1 wurde 24 h vor Beginn des Experimentes mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden mit Zell-Dissoziationspuffer von dem Flaschenboden abgelöst und in serumfreiem Medium in der An- bzw. Abwesenheit von 1 µg/ml Doxycyclin resuspendiert. Je 2×10^5 Zellen (in 0,5 ml Medium) wurden in die obere Kammer der Transwell-Platte ausgesät. In die untere Kammer wurde 1,5 ml DMEM-Medium, das 20 % FKS enthielt, mit bzw. ohne 1 µg/ml Doxycyclin gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37°C wurde zur Quantifizierung der gewanderten Zellen für die obere Kammer (Filtereinsatz) und die untere Kammer (Platte) ein MTT-Test durchgeführt. Mit einem MTT-Test kann indirekt die Zellzahl bestimmt werden. Das Prinzip dieses Testes ist vergleichbar zu dem WST-1-Test. Durch die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) entsteht allerdings ein unlösliches Formazankristall, das mit einer Isopropanol-Lösung gelöst werden muß. Zur Durchführung des MTT-Testes wurden 1/10 VT einer 5 mg/ml MTT-Lösung (in PBS) in die obere und untere Kammer gegeben. Die Platten wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Formazankristalle, die sich an der Ober- und Unterseite der Membran gebildet hatten, wurden anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, pelletiert und in 500 µl MTT-Solubilisierungspuffer üN bei 37°C gelöst.

MTT-Solubilisierungspuffer: 100 ml Isopropanol
80 µl 37%ige HCl
10 mg SDS

Die Absorption der solubilisierten Formazankristalle wurde bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) in einem 'ELISA-Reader' photometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors isoliert werden, die sich durch eine größere Bindungsspezifität für diese Rezeptor-Tyrosinkinase auszeichnen als die bereits bekannten Interaktionspartner. Solche spezifischen IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteine sollten dann in Bezug auf ihre Funktion im IGF-1 Rezeptor-Signaltransduktionssystem untersucht werden.

1. Isolierung von Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor mittels ‘2-Hybrid-Screening’ von cDNS-Bibliotheken

Das 2-Hybrid-System ist eine der vielversprechendsten Methoden, um nach Interaktionspartnern für Proteine zu suchen. Dieses System wurde hier für die Identifizierung von zytoplasmatischen Bindungspartnern des IGF-Rezeptors verwendet. Es basiert auf der Interaktion zweier Fusionsproteine, wobei das Protein, für das man Interaktionspartner sucht, an die DNS-Bindungsdomäne (BD) eines Transkriptionsfaktors fusioniert ist (Köder). Potentielle Interaktionspartner, die von einer cDNS-Bibliothek kodiert werden, sind an die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (AD) fusioniert (Fisch). Nur wenn die beiden Fusionsproteine in Hefe miteinander interagieren, wird ein funktioneller Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dies führt zu der Aktivierung eines Reportergens (*HIS3*), wodurch Wachstum auf Histidin-freiem Medium ermöglicht wird.

1.1. Etablierung des 2-Hybrid-Systems für den IGF-1 Rezeptor

Um nach neuen Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor mittels ‘2-Hybrid-Screening’ zu suchen, wurde zunächst die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors in einen Köder-Vektor, der für eine DNS-Bindungsdomäne (BD) kodiert, kloniert und im folgenden die Funktionalität des DNS-Bindungsdomänen-IGF-1 Rezeptor-Fusionsproteins überprüft.

1.1.1. Konstruktion der IGF-1 Rezeptor-Köder-Vektoren

Der IGF-1 Rezeptor gehört zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Da nur der intrazelluläre Anteil die Interaktion mit zytoplasmatischen Signaltransduktoren vermittelt, wurde nur dieser Anteil des Rezeptors in einen Köder-Vektor kloniert.

Als Köder-Vektor wurde BTM116 verwendet, der für die LexA-DNS-Bindungsdomäne kodiert. Diese DNS-Bindungsdomäne zeichnet sich dadurch aus, daß sie Dimere bildet. Die zytoplasmatische Domäne des humanen IGF-1 Rezeptors wurde C-terminal an die LexA-Bindungsdomäne fusioniert. Durch die Dimerisierung der LexA-Bindungsdomäne wird in dem fusionierten zytoplasmatischen Anteil des IGF-1 Rezeptors die Situation des aktivierten Wildtyp IGF-1 Rezeptors simuliert, so daß eine Kreuz-Autophosphorylierung der Rezeptor-Untereinheiten stattfinden kann. Bei einem ‘2-Hybrid-Screening’ mit diesem Konstrukt können daher auch Interaktionspartner gefunden werden, die nur mit der aktivierten, d.h. phosphorylierten Form des Rezeptors interagieren. Da die Autophosphorylierung von der sterischen Ausrichtung der beiden Domänen zueinander abhängig ist, wurden zwei verschiedene Konstrukte generiert, die sich in den Aminosäuren zwischen LexA- und IGF-1 Rezeptor-

Domäne unterscheiden ('Linker') (Abbildung 6). Das Konstrukt BTM116-I1 zeichnet sich gegenüber dem Konstrukt I2 durch einen zusätzlichen Prolin- und Glycinrest in diesem 'Linker' aus. Auf die gleiche Weise wurde die Kinase-inaktive Mutante des IGF-1 Rezeptors (K1033A-Austausch im ATP-Bindungsloop) an die LexA DNS-Bindungsdomäne fusioniert (BTM116-K1, BTM116-K2).

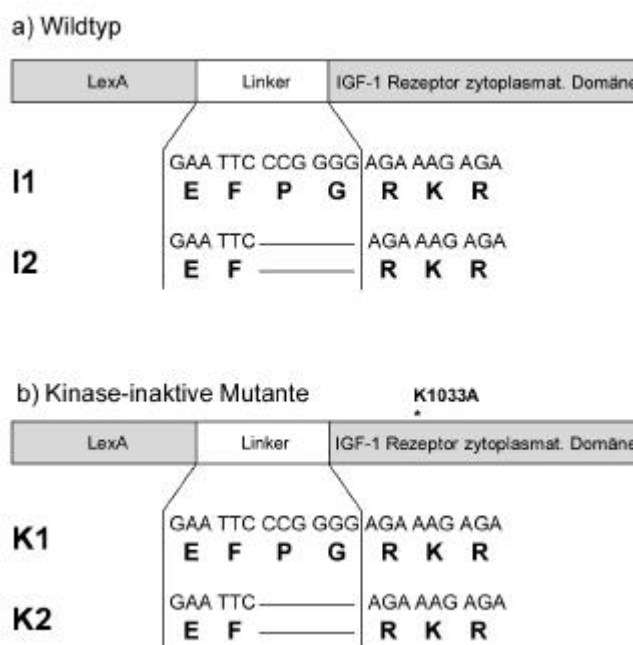


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen 'Linkerregionen' zwischen LexA- und IGF-1 Rezeptor-Domäne in dem Köder-Vektor BTM116. BTM116-I1 und BTM116-I2 kodieren für den Wildtyp Rezeptor, BTM116-K1 und BTM116-K2 für die Kinase-inaktive Mutante.

Zur Generierung dieser Fusionskonstrukte wurde mittels PCR die zytoplasmatische Domäne des humanen IGF-1 Rezeptors bzw. seiner Kinase-inaktiven Mutante amplifiziert. Als 'Template' wurden die eukaryotischen Expressionsvektoren pRK5-1714 bzw. pRK5-1564, die für den Wildtyp IGF-1 Rezeptor bzw. für die Kinase-inaktive Mutante des Rezeptors kodieren, eingesetzt. Die oben erwähnten Linker wurden mit entsprechenden 5'-Oligonukleotiden eingeführt. Für das Konstrukt BTM116-I1, das sich durch den zusätzlichen Prolin- und Glycin-Rest auszeichnet, wurde das 5'-Oligonukleotid 'I1-sense' eingesetzt, für das Konstrukt BTM116-I2 'I2-sense'. Als 3'-Oligonukleotid wurde für beide Konstrukte 'I1-reverse' verwendet. Mittels der Oligonukleotide wurden außerdem am 5'-Ende eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine SalI-Restriktionsschnittstelle eingeführt, so daß die PCR-Fragmente nach einem entsprechenden Restriktionsverdau in den Köder-Vektor BTM116 3' von der kodierenden Sequenz für die LexA-DNS-Bindungsdomäne kloniert werden konnten.

1.1.2. Evaluierung der Köder-Vektoren BTM116-I1, -I2, -K1 und -K2

Zur Evaluierung der Funktionalität der Köder-Vektoren BTM116-I1, BTM116-I2, BTM116-K1 und BTM116-K2, die für den Wildtyp IGF-1 Rezeptor (I1, I2) bzw. eine Kinase-inaktive Mutante (K1, K2) kodieren, wurden diese zunächst auf Interaktion mit einem bekannten Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors, der p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase, in einem 'Hefe-Koloniewachstumsassay' getestet

(Abbildung 7A). Man erkennt deutlich, daß der Wildtyp IGF-1 Rezeptor mit p85 α interagiert, während die Kinase-inaktive Mutante keine Bindung an p85 α zeigt. Da die Phosphorylierung des Rezeptors Voraussetzung für eine Bindung von p85 α ist, ist davon auszugehen, daß der Wildtyp Rezeptor als LexA-Fusionskonstrukt phosphoryliert werden kann. Es ist jedoch erkennbar, daß die Stärke der Interaktion interessanterweise davon abhängt, welches Köder-Konstrukt verwendet wurde. Wurde BTM116-I1, also das Konstrukt, das für einen zusätzlichen Prolin- und Glycin-Rest in dem 'Linker' zwischen LexA- und Rezeptor-Domäne kodiert, in dem 'Koloniewachstumsassay' eingesetzt, war eine starke Interaktion mit p85 α zu beobachten. Bei Verwendung von BTM116-I2 (kein 'Prolin-Glycin-Linker') ist die Bindung von p85 α an den IGF-1 Rezeptor dagegen schwächer. Dieser Befund könnte damit erklärt werden, daß durch den zusätzlichen Prolin- und Glycinrest in der 'Linkerregion' von BTM116-I1 aus sterischen Gründen eine bessere Phosphorylierung der IGF-1 Rezeptor-Domäne und damit eine stärkere Interaktion mit p85 α erreicht wird.

Diese Hypothese konnte durch anti-Phosphotyrosin-Kolonieblots bestätigt werden (Abbildung 7B). L40 Hefen, die das LexA-IGF-1 Rezeptor-Fusionsprotein mit dem 'Prolin-Glycin-Linker' (BTM116-I1) exprimierten, zeigten ein wesentlich stärkeres Phosphorylierungssignal als BTM116-I2-Transfektanten, die das Fusionsprotein ohne diesen 'Linker' exprimierten. Das Phosphorylierungssignal, das durch diese BTM116-I2-Transfektanten im anti-Phosphotyrosin-Blot erzeugt wurde, entsprach annähernd dem Hintergrundsignal, das durch die BTM116-K1- bzw. -K2-Transfektanten entstand, die die Kinase-inaktive Mutante des Rezeptors exprimierten.

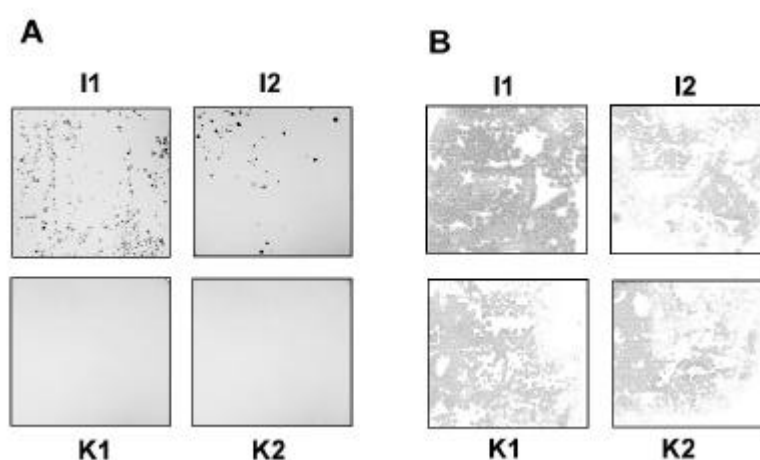


Abbildung 7: Evaluierung der IGF-1 Rezeptor-Köder-Vektoren. (A) 'Hefe-Koloniewachstumsassay'. Ein LexA-IGF-1-Rezeptor-Fusionsprotein mit einem 'Pro-Gly-Linker' zwischen IGF-1 Rezeptor- und LexA-Domäne (kodiert durch BTM116-I1) ermöglicht eine stärkere Interaktion mit p85 α als ein entsprechendes Fusionsprotein ohne 'Pro-Gly-Linker' (kodiert durch BTM116-I2). Die Kinase-inaktive Mutante (kodiert durch BTM116-K1 bzw. -K2) interagiert nicht mit p85 α . L40 Hefen wurden mit den Köder-Vektoren BTM116-I1, -I2, -K1 bzw. -K2 und dem Fisch-Vektor VP16-p85 α ko-transfiziert und mittels 'Koloniewachstumsassay' analysiert. (B) **Anti-Phosphotyrosin-Kolonieblot.** L40-Hefen, die das IGF-1 R-LexA-Fusionsprotein mit einem 'Pro-Gly-Linker' (kodiert durch BTM116-I1) exprimierten, zeigen eine stärkere Tyrosinphosphorylierung als Hefen, die ein solches Fusionsprotein ohne 'Linker' exprimierten. Die Expression der Kinase-inaktiven Mutante (kodiert durch BTM116-K1 oder -K2) resultiert lediglich in einem Hintergrundsignal. L40-BTM116-I1-, -I2-, -K1- bzw. -K2-Transfektanten wurden auf Nitrocellulose transferiert, mit Lysispuffer aufgeschlossen und mittels 'anti-PY-Immunoblot' analysiert.

Die Evaluierungsexperimente der IGF-1 Rezeptor-Köder-Vektoren ergaben, daß durch die Anwesenheit eines 'Prolin-Glycin-Linkers' zwischen LexA- und IGF-1-Rezeptor-Domäne sowohl die

Interaktion mit einem Modell-Interaktionspartner als auch die Phosphorylierung an Tyrosinresten verstärkt werden kann. Daher wurde das Konstrukt, das diesen 'Linker' enthält (BTM116-II bzw. K1), in den weiteren 2-Hybrid-Experimenten verwendet.

1.2. 'Screening' von 2-Hybrid-cDNS-Bibliotheken nach IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteinen

Nachdem durch Klonierung der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors in den Köder-Vektor BTM116 das Konstrukt BTM116-II generiert worden war, das für ein funktionelles LexA-IGF-1 Rezeptor-Fusionsprotein kodiert, wurden zwei verschiedene Aktivierungsdomänen (AD)-cDNS-Bibliotheken nach Interaktionspartnern für den IGF-1 Rezeptor durchsucht. Es wurden eine Maus-Embryo e10.5-cDNS-Bibliothek und eine Jurkat-cDNS-Bibliothek verwendet.

'Screening' der Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek

Zunächst wurde die Maus-Embryo cDNS-Bibliothek, die im Fisch-Vektor VP16 als Fusion mit der viralen VP16-Aktivierungsdomäne (Weidner et al., 1996) vorliegt, mit dem Köder-Vektor BTM116-II durchsucht. Die primäre Transfektionseffizienz dieses 'Screens' betrug $2,7 \times 10^7$, was ca. dem Fünffachen der Anzahl unabhängiger Klone der Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek (5×10^6) entspricht. Daher kann davon ausgegangen werden, daß bei diesem 'Screening' alle möglichen Protein-Interaktionspartner erfaßt wurden, die in dieser cDNS-Bibliothek enthalten sind. Nach einem Amplifikationsschritt wurden insgesamt 2×10^8 Transfektanten auf -Trp,-Leu,-His-Selektionsmedium ausplattiert. Die Wachstumsselektion erfolgte damit durch das konditional in Folge von *in vivo*-Protein-Interaktionen exprimierte *HIS3*-Gen. Durch den Zusatz von 5 mM 3-Aminotriazol zum Selektionsmedium wurde einer unspezifischen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens entgegengewirkt, um so die Anzahl falschpositiver Klone möglichst niedrig zu halten. Insgesamt wuchsen auf dem Selektionsmedium 700 His⁺-prototrophe Einzelklone, die mit einem potentiellen Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors transfektiert waren. Von diesen wurden insgesamt 313 Klone analysiert. Zunächst erfolgte die Auswertung mittels Sequenzierung. Nach den ersten Sequenzierungen zeigte sich, daß ein Großteil der Klone für die p85 α - und p85 β -Untereinheiten der PI3-Kinase und Grb10, also bekannte Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors, kodierte (Lamothe et al., 1995; Morrione et al., 1996). Im folgenden wurden diese redundanten Klone mittels 'Southern-Blots' unter Verwendung spezifischer DNS-Sonden identifiziert und verworfen. Die cDNSs, die durch dieses Verfahren selektioniert wurden, also nicht für p85 α , p85 β und Grb10 kodierten, wurden sequenziert. Außerdem wurden die durch diese cDNSs kodierten VP16-Fusionsproteine zum Ausschluß von Falschpositiven auf Interaktion mit einem nicht-relevanten Protein, in diesem Falle Lamin, untersucht. VP16-Fusionsproteine, die mit Lamin interagierten, wurden nicht mehr weitergehend analysiert. Nach Abschluß dieser Analysen ergab sich das in Tabelle 1 dargestellte Bild.

cDNS	Anzahl
p85 α , p85 β , Grb10	252
APS	24
mSH2B	3
p59fyn	1
Grb7	1

cDNS	Anzahl
nck	5
IIP-1	7
Zfp38	5
Pax3	2
Falschpositive	13

Tabelle 1: Auflistung der IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner, die im '2-Hybrid-Screening' einer Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek isoliert wurden.

Von den 313 Klonen, die insgesamt untersucht wurden, war nur ein sehr geringer Anteil, nämlich 13 Klone, falschpositiv. Die meisten isolierten cDNSs kodieren für spezifische Bindeprotein des IGF-1 Rezeptors, wobei 11 verschiedene IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner gefunden wurden, auf die in 1.2.1. und 1.2.2. näher eingegangen wird.

'Screening' der Jurkat-cDNS-Bibliothek

Um weitere IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine zu identifizieren, wurde eine zweite cDNS-Bibliothek, die aus Jurkat Zellen isoliert wurde, mit dem Köder-Vektor BTM116-II durchsucht (Germani et al., 1999). Die Jurkat-cDNS-Bibliothek liegt im Fisch-Vektor pGAD als Fusion mit der bakteriellen Gal4-Aktivierungsdomäne vor.

Die primäre Transfektionseffizienz dieses 'Screens' betrug 1×10^7 , was auch hier ca. dem Fünffachen der Anzahl unabhängiger Klone der Jurkat-cDNS-Bibliothek ($1-2 \times 10^6$) entspricht. Daher kann auch hier davon ausgegangen werden, daß alle möglichen Protein-Interaktionspartner erfaßt wurden. Nach einem Amplifikationsschritt wurden insgesamt 7×10^7 Transfektanten auf –Trp,-Leu,-His-Selektionsmedium (5 mM 3-Aminotriazol) ausplattiert, so daß die Wachstumsselektion wie unter 'Screening der Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek' beschrieben, erfolgte. Insgesamt wuchsen auf dem Selektionsmedium 300 His⁺-prototrophe Einzelklone. Von diesen wurden 182 Klone analysiert. Da sich bei der anschließenden Sequenzanalyse einiger dieser Klone zeigte, daß ein Großteil ebenfalls für die bekannten IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner p85 α , p85 β , Grb10 und desweiteren für die p55-Untereinheit der PI3-Kinase und 14-3-3 β kodierten (Furlanetto et al., 1997; Lamothe et al., 1995; Morrione et al., 1996; Mothe et al., 1997), wurden diese Klone im folgenden mit spezifischen DNS-Sonden detektiert und nicht weiter verfolgt. Die nach diesem Verfahren selektionierten cDNSs wurden sequenziert und die entsprechenden Gal4-Fusionsproteine zum Ausschluß von Falschpositiven auf Interaktion mit Lamin untersucht (s.o.). Nach Abschluß dieser Analysen ergab sich das in Tabelle 2 dargestellte Bild.

cDNS	Anzahl
p85 α , p85 β , Grb10, p55, 14-3-3 β	145
APS	1
IIP-10	11
SSI	1

cDNS	Anzahl
Falschpositive	24

Tabelle 2: Auflistung der IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner, die im '2-Hybrid-Screening' einer Jurkat-cDNS-Bibliothek isoliert wurden.

Von den 182 Klonen, die insgesamt untersucht wurden, kodierten auch bei diesem 'Screen' die meisten für spezifische Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors, wobei acht verschiedene Proteine isoliert wurden, auf die in 1.2.1. und 1.2.2. näher eingegangen wird. Es ist anzumerken, daß SSI ('STAT induced STAT-Inhibitor', AC: AB000734) nicht weiter analysiert wurde, da SSI nur eine äußerst schwache Wechselwirkung mit dem IGF-1 Rezeptor zeigte. In diesem 'Screen' waren 24 Klone falschpositiv, also ein etwas höherer Anteil als bei dem 'Screen' der Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek.

1.2.1. Die im '2-Hybrid-Screening' isolierten bekannten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

In dem '2-Hybrid-Screening' der beiden cDNS-Bibliotheken wurden eine Reihe von schon beschriebenen Bindungspartnern des IGF-1 Rezeptors isoliert. Dies ist positiv zu bewerten, da so davon auszugehen ist, daß die isolierten bislang unbekannten Interaktionspartner relevante Bindungspartner des Rezeptors darstellen. Zu den bekannten Bindungspartnern, die in diesen 'Screens' isoliert wurden, zählen die p85 α -, die p85 β - und die p55-Untereinheiten der PI3-Kinase (Lamothe et al., 1995; Mothe et al., 1997), Grb10 (Morriane et al., 1996), SH2B (Wang und Riedel, 1998) und 14-3-3 β (Furlanetto et al., 1997). Die phosphorylierungsabhängige Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor konnte in 'Hefe-Koloniewachstumsassays' bestätigt werden (Abbildung 8).

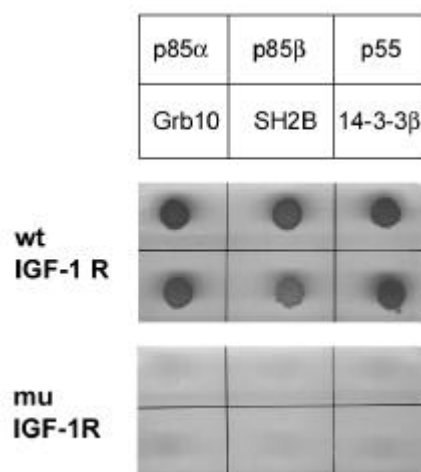


Abbildung 8: 'Hefe-Koloniewachstumsassay' zur Verifizierung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und bekannten Bindungspartnern, die in '2-Hybrid Screens' isoliert wurden. Alle getesteten Proteine interagieren mit dem Wildtyp IGF-1 Rezeptor, jedoch nicht mit der Kinase-inaktiven Mutante (muIGF-1 Rezeptor). L40 Hefen wurden mit den Köder-Vektoren BTM116-II bzw -KI und Fisch-Vektoren, die für die entsprechenden bekannten IGF-1 Rezeptor-Interaktionspartner kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

Bis auf 14-3-3 β handelt es sich bei den isolierten Proteinen um Signalproteine, die eine SH2-Domäne, eine bekannte Phosphotyrosin-Interaktionsdomäne, enthalten. Interessanterweise ergab die Sequenzanalyse, daß die isolierten cDNSs jeweils für die SH2 Domäne der Proteine kodieren (Abbildung 9). Dieser Befund bestätigt die veröffentlichten Daten, daß die SH2-Domäne dieser Signalproteine die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor vermittelt. Die 14-3-3-cDNS kodiert für die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins (Abbildung 9). 14-3-3 Proteine zeichnen sich nicht durch eine distinkte Protein-Interaktions-Domäne aus, sind jedoch bekannt dafür, daß sie an Phosphoserin- bzw. Phosphothreonin-Reste binden.

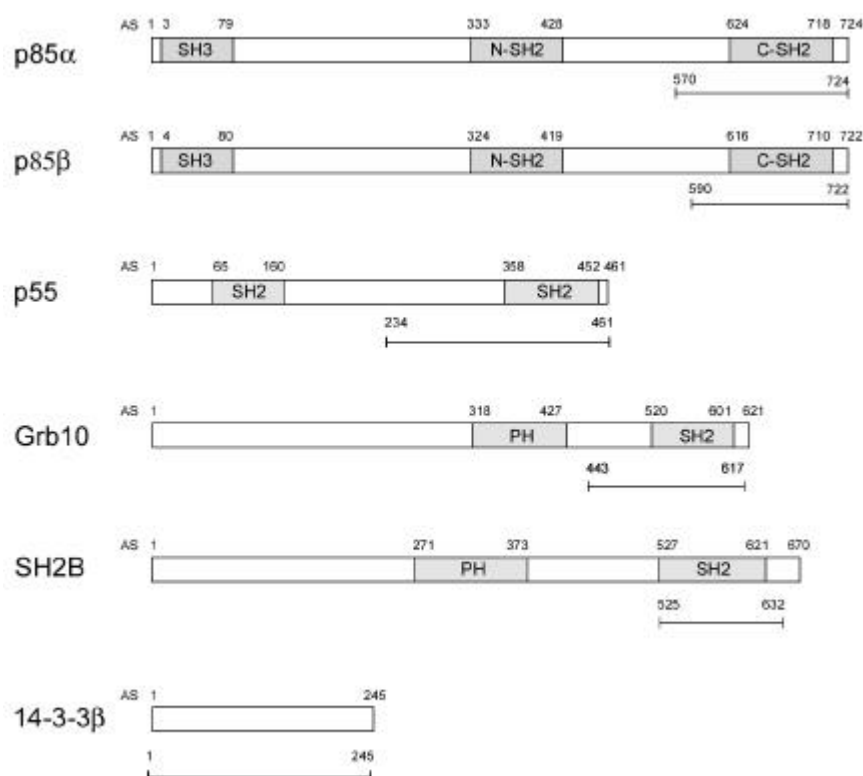


Abbildung 9: Schematische Darstellung der im '2-Hybrid-Screen' isolierten cDNS-Klone, die für bekannte IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine kodieren.

1.2.2. Die im '2-Hybrid-Screening' isolierten neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

Interessanterweise wurden auch Proteine isoliert, die bislang noch nicht als IGF-1 Rezeptor-bindende Proteine beschrieben sind. Unter ihnen sind einige Proteine, die sich durch eine SH2-Domäne auszeichnen wie APS, das als c-kit interagierendes Protein erstmals beschrieben wurde (Yokouchi et al., 1997), die src-ähnliche Kinase p59fyn (Cooke und Perlmutter, 1989) und die Adaptorproteine Grb7 und nck β (Keegan und Cooper, 1996; She et al., 1997). Es ist anzunehmen, daß die SH2-Domäne dieser Proteine auch die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor vermittelt, da die isolierten partiellen cDNSs jeweils für den Bereich des Proteins kodieren, der die SH2-Domäne beinhaltet (Abbildung 10).

Neben diesen SH2-Proteinen wurden auch einige Proteine als IGF-1 Rezeptor-Bindungspartner isoliert, die sich nicht durch eine SH2-Domäne oder eine PTB-Domäne auszeichnen. Dazu gehört das Zinkfinger-Protein Zfp38, das sieben Cys₂His₂-Zink-komplexierende Finger aufweist (Noce et al., 1992). Für die Bindung von Zfp38 an den IGF-1 Rezeptor sind scheinbar die Zinkfinger-Motive verantwortlich, da der isolierte cDNS-Klon für zwei der sieben Cys₂His₂-Zinkfinger kodiert (Abbildung 10). Eine andere partielle cDNS, die in dem IGF-1 Rezeptor-'Screen' isoliert wurde, kodiert für die Homeobox-Domäne von Pax3 (Abbildung 10) (Goulding et al., 1991).

Außerdem wurden zwei partielle cDNS-Klone isoliert, deren Sequenzen zu diesem Zeitpunkt noch nicht als 'volle Länge cDNS' veröffentlicht waren. Diese Klone wurden als IIP-1 und IIP-10 (für IGF-1 Rezeptor-interagierendes Protein-1 und -10) bezeichnet. Von IIP-1 war lediglich ein partieller cDNS Klon, der für das Tax-interagierende Protein-2 kodiert, bekannt (Rousset et al., 1998). Im Verlauf dieser Arbeit wurde IIP-1 außerdem als GIPC ('GAIP interacting protein, C-terminus') beschrieben, das mit dem RGS ('regulator of G protein signaling')-Protein GAIP ('Gα interacting protein') interagiert. Die kodierende Region von IIP-1 ist identisch zu der von GIPC. Lediglich der 5'-untranslatierte Bereich von GIPC (nt1-55) unterscheidet sich von dem von IIP-1. In Abbildung 10 sind die beiden partiellen cDNS-Klone von IIP-1 dargestellt, die in dem '2-Hybrid-Screening' isoliert wurden. Interessanterweise kodieren beide für die PDZ-Domäne des Proteins, einer bekannten Protein-Interaktionsdomäne. Die Bezeichnung PDZ leitet sich von PSD-95, Dlg und ZO-1 ab, den ersten Proteinen, in denen diese Protein-Interaktionsdomäne entdeckt wurde (Ponting et al., 1997).

Zum Zeitpunkt der Identifizierung von IIP-10 als IGF-1 Rezeptor-interagierendes Protein war auch diese kodierende Sequenz noch nicht in den öffentlichen cDNS-Datenbanken registriert. In dem '2-Hybrid-Screen' wurde nur ein partieller Klon von IIP-10 isoliert und erst im Verlauf der Arbeit wurde die volle Länge unabhängig von dieser Arbeit veröffentlicht (AC: AF161493). Die mRNS, auf die sich der Datenbankeintrag bezieht, wurde aus CD34⁺-Stammzellen isoliert und zeigt starke Homologien zu dem *Gallus gallus* Thymozyten Protein A1 (Thomson et al., 1997). Der mit dem IGF-1 Rezeptor-interagierende Klon von IIP-10 kodiert fast für das gesamte Protein, das keine der bislang bekannten Protein-Interaktionsdomänen aufweist (Abbildung 10).

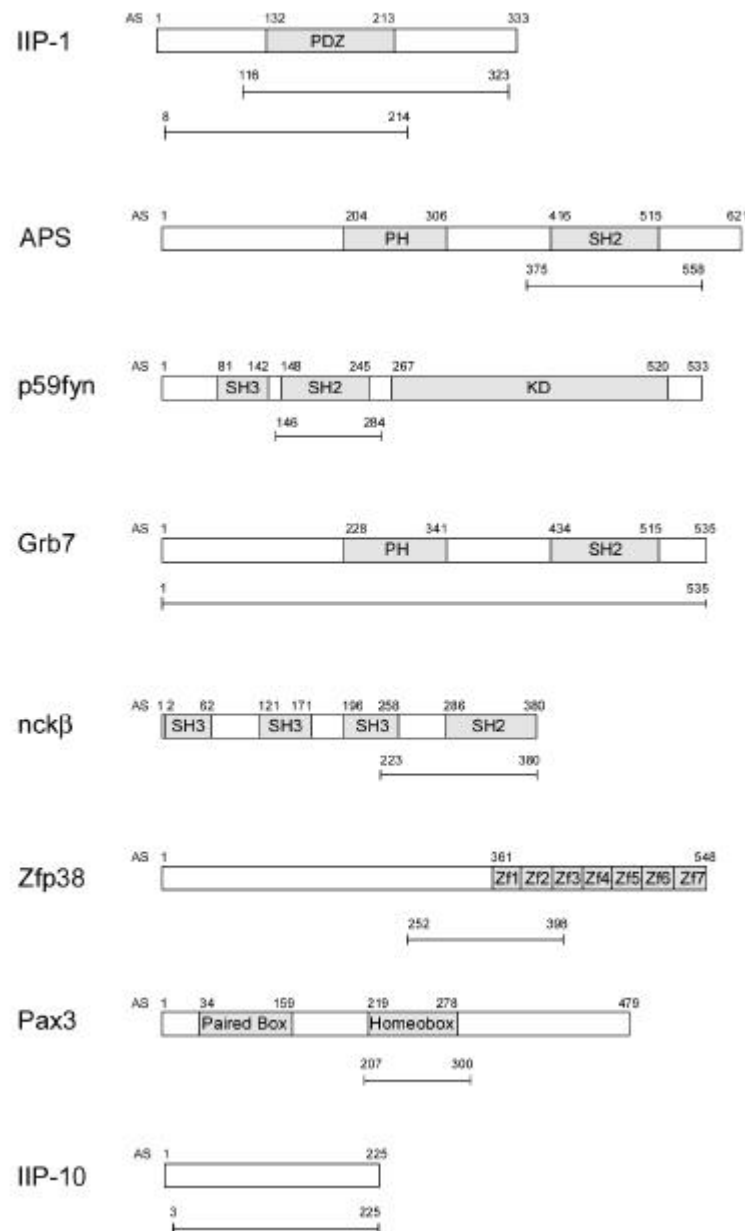


Abbildung 10: Schematische Darstellung der in '2-Hybrid-Screens' isolierten cDNS-Klone, die für neue IGF-1 Rezeptor-interagierende Protein kodieren.

In einem 'Hefe-Koloniewachstumsassays' konnte die Interaktion zwischen Wildtyp IGF-1 Rezeptor und den neuen Bindungspartnern, die in den '2-Hybrid-Screens' isoliert wurden, bestätigt werden (Abbildung 11). Um zu untersuchen, ob die Protein-Interaktionen von der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors abhängig sind, wurde auch die Kinase-inaktive Mutante des IGF-1 Rezeptors (mu IGF-1 Rezeptor) in dem 'Hefe-Koloniewachstumsassays' getestet (Abbildung 11). Die SH2-Proteine APS, p59fyn, Grb7, und nckβ interagierten nur mit dem aktivierten Rezeptor, was eine SH2-vermittelte Phosphotyrosin-Interaktion widerspiegelt. Auch das Zinkfinger-Protein Zfp38 und Pax3 binden Kinase-abhängig an den Rezeptor. Interessanterweise interagiert IIP-1 sowohl mit dem Wildtyp Rezeptor als auch mit der Kinase-inaktiven Mutante. IIP-10 dagegen interagiert wiederum nur mit der aktivierten, phosphorylierten Form des Rezeptors.

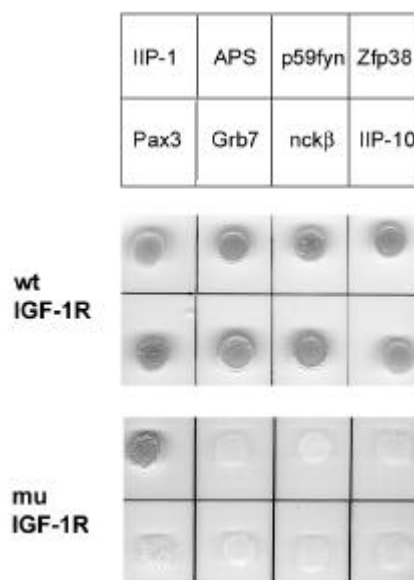


Abbildung 11: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay’ zur Verifizierung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und in ‘2-Hybrid Screens’ isolierten neuen Bindungspartnern. Mit Ausnahme von IIP-1 interagieren alle getesteten Proteine mit dem Wildtyp IGF-1 Rezeptor, aber nicht mit der Kinase-inaktiven Mutante des Rezeptors (mu IGF-1R). IIP-1 jedoch bindet sowohl an den Wildtyp Rezeptor als auch an die Kinase-inaktive Mutante. L40 Hefen wurden mit BTM116-11 bzw. -K1 und Fisch-Vektoren, die für die entsprechenden neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

1.2.3. Charakterisierung der Bindungsspezifität der neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Identifizierung IGF-1 Rezeptor-bindender Proteine liegt, die spezifisch für diesen Rezeptor sind, wurden die unter 1.2.2. beschriebenen neuen Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors auf Interaktion mit dem Insulin Rezeptor im 2-Hybrid-System getestet. Der Insulin-Rezeptor ist innerhalb der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen am nächsten verwandt mit dem IGF-1 Rezeptor. ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ (Abbildung 12) zeigten, daß sowohl die SH2-Proteine APS, p59fyn, Grb7 und nck β als auch Zfp38 und Pax3 mit dem Insulin Rezeptor interagierten. Überraschenderweise zeigten jedoch IIP-1 und IIP-10 keine Interaktion mit dem Insulin Rezeptor. Diese beiden Proteine weisen also zumindest im Vergleich mit dem Insulin Rezeptor eine Bindungsspezifität für den IGF-1 Rezeptor auf. Dieser Befund war ein erster Hinweis darauf, daß in den ‘2-Hybrid-Screens’ spezifischere Interaktionspartner für den IGF-1 Rezeptor gefunden worden waren. Die Relevanz als IGF-1 Rezeptor-bindende Proteine wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher untersucht.

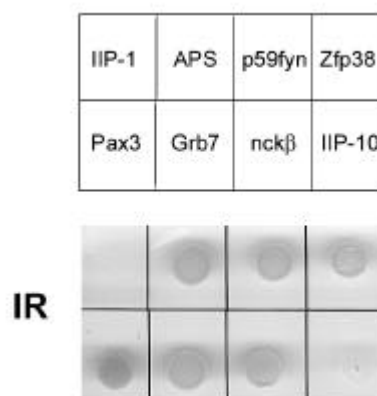


Abbildung 12: 'Hefe-Koloniewachstumsassay' zur Untersuchung der Interaktion zwischen Insulin Rezeptor und den neuen in '2-Hybrid-Screens' isolierten IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteinen (IIPs). Alle getesteten Proteine mit Ausnahme von IIP-1 und IIP-10 interagieren mit dem Insulin Rezeptor. L40 Hefen wurden mit dem BTM116-Köder-Vektor, der für den Insulin-Rezeptor kodiert, und Fisch-Vektoren, die für die entsprechenden neuen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

1.2.4. Weitergehende Charakterisierung der Bindungsspezifität von IIP-1

In 1.2.3. konnte gezeigt werden, daß IIP-1 nicht mit dem dem IGF-1 Rezeptor sehr verwandten Insulin Rezeptor interagiert. Um zu untersuchen, ob IIP-1 jedoch an andere Rezeptor-Tyrosinkinasen bindet, wurden verschiedene Vertreter dieser Rezeptor-Familie wie c-ros, c-met, c-ret, c-kit und c-fms in 'Hefe-Koloniewachstumsassays' auf Interaktion mit IIP-1 getestet (Abbildung 13). Interessanterweise zeigte keine dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Bindung an IIP-1, alle interagierten jedoch mit der p85β-Untereinheit der PI3-Kinase. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß IIP-1 ein spezifisches Bindeprotein des IGF-1 Rezeptors ist, das nicht mit einer Reihe von anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen interagiert.

Dieser '2-Hybrid-Kolonie-Wachstumsassay' wurde bei einer Stringenz von 25 mM 3-Aminotriazol durchgeführt. Selbst bei dieser hohen Konzentration von 3-Aminotriazol konnten Hefekolonien, die mit den 2-Hybrid-Vektoren für den IGF-1 Rezeptor und IIP-1 transfiziert waren, auf dem Selektionsmedium wachsen, was auf eine starke Interaktion zwischen dem IGF-1 Rezeptor und IIP-1 hinweist.

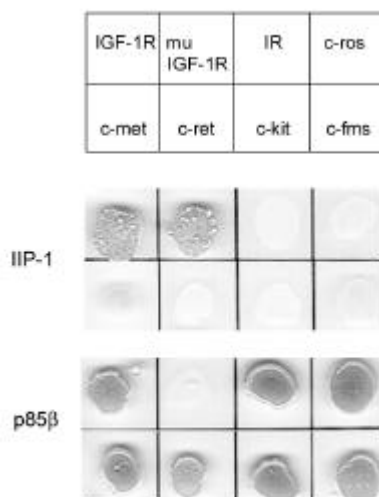


Abbildung 13: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay’ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1 und verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen. IIP-1 interagiert lediglich mit dem Wildtyp IGF-1 Rezeptor und der Kinase-inaktiven Mutante (mu IGF-1 Rezeptor), jedoch nicht mit den anderen getesteten Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese zeigten jedoch Bindung an p85 β . L40 Hefen wurden mit BTM116-Köder-Vektoren, die für die entsprechenden Rezeptor-Tyrosinkinasen kodieren, und VP16-Fisch-Vektoren, die für IIP-1 bzw. p85 β kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium, dem 25 mM 3-Aminotriazol zugesetzt waren.

Interessanterweise zeigen auch andere PDZ-Proteine Spezifität für bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen. Zwei PDZ-Proteine, PDZ-1 und PDZ-2, die in ‘2-Hybrid-Screens’ mit c-kit bzw. c-ret gefunden wurden, binden jeweils nur an diese Rezeptoren und nicht an den IGF-1 Rezeptor, während IIP-1 nur mit dem IGF-1 Rezeptor interagiert (Abbildung 14).

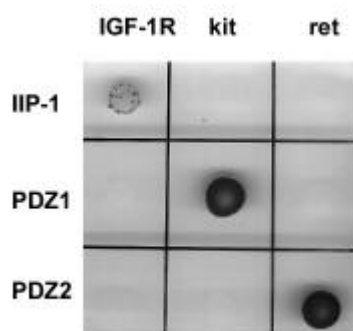


Abbildung 14: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay’ zur Untersuchung der Bindungsspezifität von Rezeptor-Tyrosinkinase-bindenden PDZ-Proteinen. IIP-1 interagiert lediglich mit dem IGF-1 Rezeptor, PDZ-1 nur mit c-kit und PDZ-2 nur mit c-ret. L40 Hefen wurden mit BTM116-Köder-Vektoren, die für den IGF-1 Rezeptor bzw. c-kit und c-ret kodieren, und VP16-Fisch-Vektoren, die für IIP-1 bzw. PDZ-1 und PDZ-2 kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

2. Klonierung von IIP-1

Die Daten, die in den in 1.2.3. und 1.2.4. dargestellten 2-Hybrid-Experimenten über IIP-1 erhalten wurden, gaben Grund zu der Annahme, daß IIP-1 eine Rolle als spezifisches Bindeprotein für den IGF-1 Rezeptor spielt. Um die Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor näher untersuchen zu können, wurde zunächst die gesamte kodierende Sequenz von humanem IIP-1 kloniert.

2.1. Klonierung von IIP-1 und einer Spleißvariante (IIP-1/p26) mittels RT-PCR

Die ‘volle-Länge-cDNS’ von humanem IIP-1 wurde aus folgenden Datenbankeinträgen zusammengesetzt:

nt 1-299: EST BE019401 (EMBL Datenbank) nt 85-383

nt 300-404: EST BE729338 (EMBL Datenbank) nt 204-308

nt 455-1819: TIP-2 cDNS (AF028824, EMBL Datenbank) nt 1-1416

Die kodierende Sequenz umfaßt nt 175-1173. Um diese Sequenz über RT-PCR zu klonieren, wurden Oligonukleotide generiert, die im 5'- und 3'-Bereich des offenen Leserahmens hybridisieren.

‘IIP-1-sense’: nt 113-130

‘IIP-1-reverse’: nt 1188-1205

Diese Oligonukleotide wurden in einer RT-PCR-Reaktion unter Verwendung von Gesamt-RNS von MCF-7-Zellen eingesetzt. Es wurden zwei PCR-Fragmente erhalten, ein größeres mit einer Länge von 1093 nt, das der cDNS von IIP-1 entspricht, und ein kleineres mit einer Länge von 775 nt (Abbildung 15). Diese beiden Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert (pCR2.1-IIP-1, pCR2.1-IIP-1/p26). Sequenzanalysen zeigten, daß nt 145-462 der ‘volle-Länge-cDNS’ in dem kleineren PCR-Fragment fehlten. Diese Sequenz beinhaltet auch das Start-Kodon von IIP-1. Um herauszufinden, ob die kürzere IIP-1-cDNS durch eine alternative Spleißreaktion entstanden ist, wurde die Exon-Intron-Organisation von IIP-1 mittels Recherche in genomischen Datenbanken analysiert. Die IIP-1-cDNS wird durch 8 Exons kodiert. Interessanterweise umfaßt Exon3 genau die 318 nt, die in dem kleineren PCR-Fragment fehlen. Die kürzere cDNS von IIP-1 scheint daher aus einer alternativen Spleißreaktion hervorgegangen zu sein. Diese alternativ gespleißte Form enthält nicht Exon3. Als Start-Kodon wird vermutlich das erste ATG in Exon4 benützt.

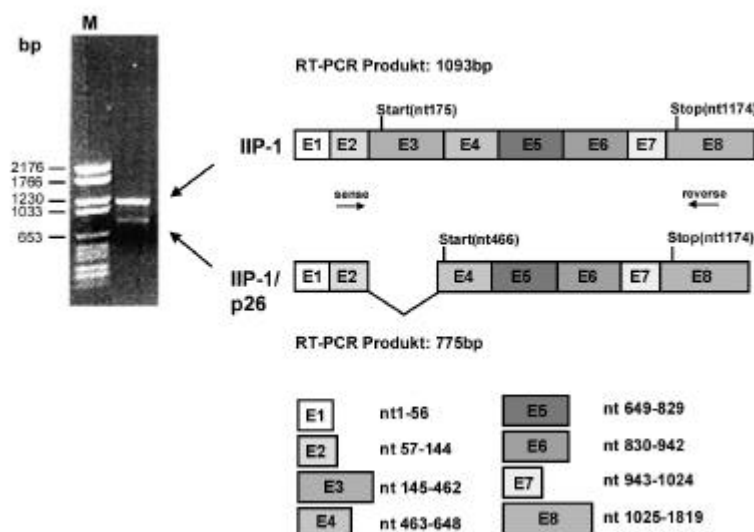


Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Reaktion, durch die die ‘volle-Länge-cDNS’ von IIP-1 generiert wurde. Die beiden RT-PCR-Produkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Exon-Organisation von IIP-1 ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Oligonukleotide, die in der RT-PCR-Reaktion verwendet wurden, ‘IIP-1-sense’ (sense) und ‘IIP-1-reverse’ (reverse), hybridisieren in Exon2 bzw. Exon8.

Die längere cDNS von IIP-1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 333 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 36 kD, die alternativ gespleißte Form kodiert für ein kleineres Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 26 kD. Diese Form wurde daher als IIP-1/p26 bezeichnet. IIP-1 besteht aus einer N-terminalen Region (AS 1-131), der zentralen PDZ-Domäne (AS 132-213) und einer C-terminalen Region (AS 214-333) (Abbildung 16). Die Aminosäuren 1-97 von IIP-1 fehlen in IIP-1/p26, so daß die N-terminale Region von IIP-1/p26 kleiner ist als die von IIP-1. Sowohl die PDZ-Domäne als auch die C-terminale Region sind jedoch in voller Länge vorhanden.

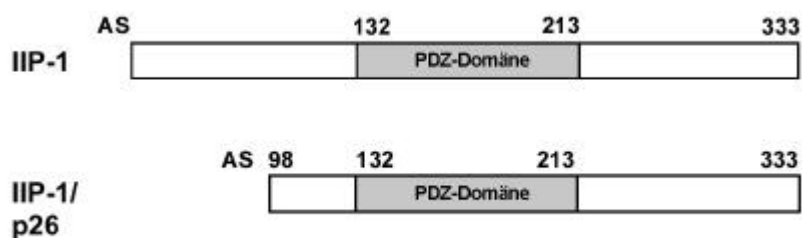


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IIP-1 und IIP-1/p26.

Eine PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-1 (Abbildung 17) ergab, daß IIP-1 mehrere putative Casein-Kinase II- und Protein Kinase C-Phosphorylierungsstellen und N-Myristylierungsstellen sowie eine putative 'Acyl Carrier Protein' (ACP)-Domäne beinhaltet. ACP-Domänen vermitteln u.a. die Palmitylierung anderer Proteine (Joshi et al., 1998). Außerdem ist N-terminal eine Glycinreiche Region zu finden.



Abbildung 17: PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-1.

Sowohl die kodierende Sequenz von IIP-1 als auch die von IIP-1/p26 wurden mittels PCR in den Fisch-Vektor VP16 kloniert. Für die PCR wurde als 'Template' pCR2.1-IIP-1 bzw. pCR2.1-IIP-1/p26 verwendet. Für die Amplifizierung der IIP-1-cDNS wurden die Oligonukleotide 'VP16-IIP-1-sense'

und 'VP16-IIP-1-reverse' eingesetzt, die zusätzlich *NotI*-Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in den AD-Vektor VP16 beinhalten. Für die Amplifizierung der IIP-1/p26-cDNS wurde das gleiche 3'-Oligonukleotid ('VP16-IIP-1-reverse') verwendet, jedoch als 5'-Oligonukleotid 'VP16-IIP-1/p26-sense' eingesetzt. Die resultierenden Plasmide wurden als VP16-IIP-1 bzw. VP16-IIP-1/p26 bezeichnet.

2.2. Interaktion der Spleißvariante IIP-1/p26 mit dem IGF-1 Rezeptor

Die Spleißvariante IIP-1/p26 wurde auf Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor in einem 'Hefe-Koloniewachstumsassay' untersucht (Abbildung 18). Trotz einer trunkierten N-terminalen Domäne interagiert auch IIP-1/p26 mit dem IGF-1 Rezeptor, wobei die Interaktion wie auch bei IIP-1 unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus des Rezeptors ist.

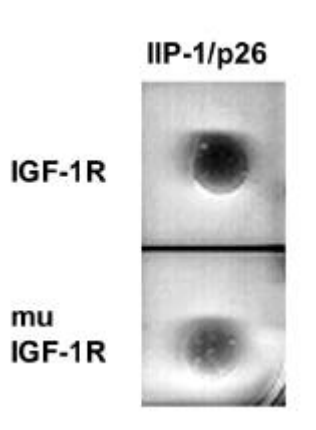


Abbildung 18: 'Hefe-Koloniewachstumsassay' zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1/p26 und dem IGF-1 Rezeptor. IIP-1/p26 interagiert sowohl mit dem Wildtyp IGF-1 Rezeptor als auch mit der Kinase-inaktiven Mutante (mu IGF-1 Rezeptor). L40 Hefen wurden mit BTM116-11 bzw. -K1 und VP16-IIP-1/p26 kotransfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

3. Charakterisierung der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor im 2-Hybrid-System

3.1. Identifizierung der PDZ-Domäne von IIP-1 als Bindedomäne für den IGF-1 Rezeptor

IIP-1 zeichnet sich durch eine zentrale PDZ-Domäne aus. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei dieser Domäne um eine Protein-Interaktionsdomäne, die in sehr vielen Membran-assoziierten Proteinen vorkommt und die Interaktion mit Membran-assoziierten Proteinen wie 'tight junction'-Elementen, Ionenkanälen und Signaltransduktoren vermittelt (Ponting et al., 1997). Im folgenden wurde untersucht, ob die PDZ-Domäne von IIP-1 auch die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor vermittelt.

Die in dem '2-Hybrid-Screen' isolierten partiellen Klone von IIP-1, IIP-1a und IIP-1b, kodieren beide für die PDZ-Domäne (Abbildung 10, Abbildung 19). IIP-1a (AS 116-323) besteht aus der PDZ-Domäne und der C-terminalen Region von IIP-1. In IIP-1b (AS 8-214) fehlt der C-Terminus, die N-terminale Region und die PDZ-Domäne sind dagegen vorhanden. Sowohl IIP-1a als auch IIP-1b interagierten mit dem IGF-1 Rezeptor in einem 'Hefe-Koloniewachstumsassay' (Abbildung 19). Schon dieser Befund weist daraufhin, daß die PDZ-Domäne eine essentielle Rolle für die Bindung an den IGF-1 Rezeptor spielt. Um die Bedeutung dieser Domäne für die Interaktion mit dem IGF-1

Rezeptor genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Deletionsmutanten von IIP-1 hergestellt und in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ auf Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor getestet.

3.1.1. Klonierung der IIP-1-Deletionsmutanten

Es wurden drei verschiedene Deletionsmutanten von IIP-1 generiert, in denen weder die N- noch die C-terminalen Regionen von IIP-1 vorhanden sind. Eine Mutante umfaßt jedoch noch die gesamte PDZ-Domäne (PDZ, AS 118-229), während in den beiden anderen Mutanten N- bzw. C-terminale Anteile dieser Domäne deletiert sind (PDZ Δ N, AS 150-214; PDZ Δ C, AS 129-188). Die Generierung der Deletionsmutanten erfolgte mittels PCR unter Verwendung der ‘volle-Länge-cDNS’ von IIP-1 (in pCR2.1, siehe 2.1.), wobei am 5’- und am 3’-Ende *NotI*-Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in den Fisch-Vektor VP16 eingeführt wurden. Für die Herstellung des Konstruktes VP16-PDZ wurden die Oligonukleotide ‘PDZ-sense’ bzw. ‘PDZ-reverse’ verwendet, für die Generierung des Konstruktes PDZ Δ N ‘PDZ Δ N-sense’ und ‘PDZ Δ N-reverse’ und für die Generierung des Konstruktes PDZ Δ C die Oligonukleotide ‘PDZ Δ C-sense’ und ‘PDZ Δ C-reverse’. Nach entsprechendem Restriktionsverdau konnten die PCR-Fragmente in den Fisch-Vektor VP16 kloniert werden. Die resultierenden Plasmide wurden als VP16-PDZ, VP16-PDZ Δ N und VP16-PDZ Δ C bezeichnet.

3.1.2. Interaktion zwischen IIP-1-Deletionsmutanten und IGF-1 Rezeptor in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’

Die unter 3.1.1. beschriebenen Deletionsmutanten von IIP-1, die entweder noch die gesamte PDZ-Domäne von IIP-1 umfassen (PDZ, AS 118-229), oder durch N- bzw. C-terminale Deletionen dieser Domäne charakterisiert sind (PDZ Δ N, AS 150-214; PDZ Δ C, AS 129-188), wurden im 2-Hybrid-System auf Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor getestet, um zu untersuchen, ob die PDZ-Domäne alleine die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor vermitteln kann (Abbildung 19).

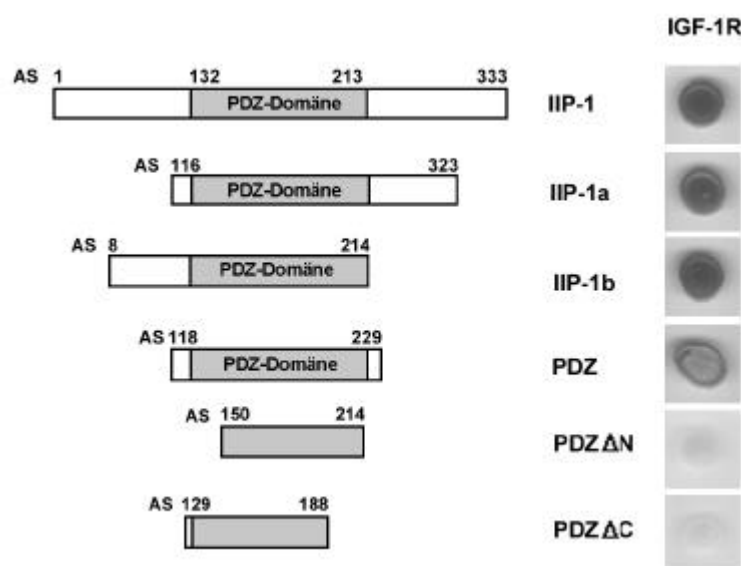


Abbildung 19: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay’ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IGF-1 Rezeptor und Deletionsmutanten von IIP-1. Der IGF-1 Rezeptor zeigt Interaktion mit IIP-1a, IIP-1b und der PDZ-Domäne alleine, jedoch nicht mit den Deletionsmutanten PDZ Δ N und PDZ Δ C. L40 Hefen wurden mit BTM116-II und VP16-Fisch-Vektoren, die für IIP-1, IIP-1a bzw. IIP-1b oder für die Deletionsmutanten PDZ, PDZ Δ N oder PDZ Δ C kodieren, ko-transfiziert. Die Wachstumsselektion erfolgte auf His-defizientem Medium.

In diesen ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ zeigte die PDZ Domäne alleine immer noch Bindung an den IGF-1 Rezeptor. Sind jedoch N- oder C-terminale Bereiche dieser Domäne wie in PDZ Δ N und PDZ Δ C deletiert, ist keine Interaktion mehr mit dem IGF-1 Rezeptor möglich.

Die Ergebnisse dieser ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ belegen eindeutig, daß die PDZ-Domäne von IIP-1 für die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor essentiell ist. Die N- und C-terminale Region von IIP-1 scheinen an der Interaktion nicht beteiligt zu sein.

3.2. Identifizierung des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1

PDZ-Domänen binden oftmals an den C-Terminus ihrer Interaktionspartner (Ponting et al., 1997), wobei die letzten 3 Aminosäuren besonders wichtig für die Interaktion sind. Um zu untersuchen, ob auch der C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1 fungiert, wurden der Wildtyp C-Terminus des IGF-1 Rezeptors (letzte elf Aminosäuren) bzw. mutierte C-Termini, in denen einzelne Aminosäuren gegen die korrespondierenden Aminosäuren des Insulin Rezeptors ausgetauscht sind, auf Interaktion mit IIP-1 in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ untersucht.

3.2.1. Klonierung von IGF-1 Rezeptor-Peptiden in den Köder-Vektor BTM116

Zur Herstellung der LexA-Fusionsproteine, die für den Wildtyp C-Terminus des IGF-1 Rezeptors bzw. für mutierte C-Termini kodieren, wurden entsprechende komplementäre Oligonukleotide generiert, hybridisiert und in die *EcoRI/SalI*-Restriktionsschnittstellen des Köder-Vektors BTM116 kloniert.

In

Tabelle 3 sind die einzelnen Peptide und die entsprechenden Oligonukleotide, die für die Klonierung der Peptide verwendet wurden, aufgelistet.

Bezeichnung	Peptid	5' Oligonukleotid	3'-Oligonukleotid
IGF-1R*	C-terminale 11 AS des IGF-1 R	IGF-1R*-sense	IGF-1R*-reverse
IR*	C-terminale 11 AS des IR	IR*- sense	IR*-reverse
IR*NPS→STC	C-terminale 11AS des IR, wobei die C-terminale 3 AS gg. die korrespond. AS des IGF-1R ausgetauscht sind.	IR*NPS→STC-sense	IR*NPS→STC-reverse
IGF-1R*S→N	C-terminale 11 AS des IGF-1R, wobei die letzte AS gg. die korrespond. AS des IR ausgetauscht ist.	IGF-1R*S→N-sense	IGF-1R*S→N-reverse
IGF-1R*T→P	C-terminale 11 AS des IGF-1R, wobei die vorletzte AS gg. die korrespond. AS des IR ausgetauscht ist.	IGF-1R*T→P-sense	IGF-1R*T→P-reverse
IGF-1R*C→S	C-terminale 11 AS des IGF-1R, wobei die drittletzte AS gg. die korrespond. AS des IR ausgetauscht ist.	IGF-1R*C→S-sense	IGF-1R*C→S-reverse

Tabelle 3: Auflistung der IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) -Insulin Rezeptor (IR) -Peptide und der entsprechenden Oligonukleotide, die in den Köder-Vektor BTM116 kloniert wurden.

3.2.2. Interaktion von IGF-1 Rezeptor-Peptiden mit IIP-1 in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’

Die in 3.2.1. aufgeführten C-terminalen IGF-1 Rezeptor-Peptide wurden in ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ auf Interaktion mit IIP-1 getestet, um die Bedeutung des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1 herauszufinden (Abbildung 20, unterer Teil). Außerdem wurde die Stärke der Peptid-IIP-1-Interaktionen mittels eines ‘ β -Galaktosidase-Assays’ quantifiziert (Abbildung 20, oberer Teil). Diese Untersuchungen ergaben, daß die C-terminalen 11 Aminosäuren des IGF-1 Rezeptors (IGF-1R*) ausreichend für die Bindung an IIP-1 sind. Die ‘Hefe-Koloniewachstumsassays’ zeigten sogar, daß die Bindung von IIP-1 an das IGF-1 Rezeptor-Peptid ähnlich stark ist wie die Bindung an die gesamte zytoplasmatische Domäne des Rezeptors. Im Gegensatz dazu konnte sowohl mittels des ‘Koloniewachstumsassays’ als auch durch ‘ β -Galaktosidase-Assays’ gezeigt werden, daß IIP-1 nicht an die C-terminalen elf Aminosäuren des Insulin Rezeptors (IR*) bindet. Dies ist bemerkenswert, da fünf Aminosäuren dieser elf C-terminalen Aminosäuren zwischen Insulin Rezeptor und IGF-1 Rezeptor identisch sind.

Die besondere Bedeutung der letzten drei Aminosäuren des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors (STC) als Bindungsstelle für IIP-1 konnte durch Analyse der ‘IGF-1 Rezeptor-Insulin Rezeptor-Hybrid-Peptide’ demonstriert werden. Interessanterweise interagierte IIP-1 mit einem mutierten C-Terminus des Insulin Rezeptors, in dem die letzten drei Aminosäuren gegen die korrespondierenden Aminosäuren des IGF-1 Rezeptors ausgetauscht sind (IR*NPS→STC). Umgekehrt konnten Peptide, die aus einem mutierten C-Terminus des IGF-1 Rezeptors bestehen, in dem jeweils eine der letzten drei Aminosäuren durch die korrespondierende Aminosäure des Insulin Rezeptors ersetzt ist (IGF-1R*S→N, IGF-1R*T→P, IGF-1R*C→S), nicht mehr an IIP-1 binden.

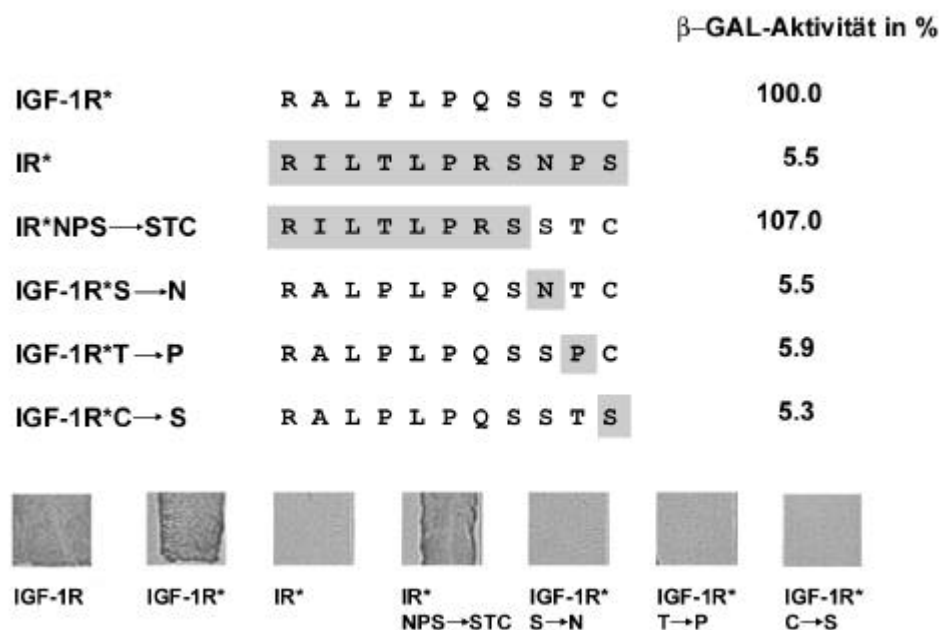


Abbildung 20: ‘Hefe-Koloniewachstumsassay’ bzw. ‘ β -Galaktosidase-Assay’ zur Untersuchung der Interaktion zwischen IIP-1 und C-terminalen IGF-1 Rezeptor-Peptiden. Für die Vermittlung der Interaktion mit IIP-1 sind die letzten drei Aminosäuren des IGF-1 Rezeptors besonders wichtig. L40 Hefen wurden mit BTM116-II oder BTM116-Köder-Vektoren, die für C-terminale Peptide des Rezeptors kodieren, und dem Fisch-Vektor VP16-IIP-1 ko-transfiziert. Die Transfektanten wurden entweder auf β -Galaktosidase-Aktivität untersucht (oberer Teil) oder auf His-defizientem Medium auf Wachstum getestet (unterer Teil). β -Galaktosidase-Einheiten sind als % von dem Ansatz, in dem das Wildtyp IGF-1 Rezeptor Peptid (IGF-1R*) verwendet wurde, angegeben.

Diese Daten zeigen deutlich, daß die C-terminalen elf Aminosäuren des IGF-1 Rezeptors ausreichen, um eine Interaktion mit IIP-1 zu vermitteln, und daß die letzten drei Aminosäuren (STC) für diese Interaktion notwendig sind. Der übrige Teil der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors ist für die Interaktion mit IIP-1 nicht relevant.

4. Nachweis der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor *in vitro* und in Säugetierzellen

Interaktionen, die im 2-Hybrid-System identifiziert werden, sollten in biochemischen ‘Assay’-Systemen verifiziert werden, um die Relevanz der Wechselwirkung zu untermauern. Daher wurde zum einen die Bindung von gereinigtem IIP-1 an den humanem IGF-1 Rezeptor und zum anderen die Interaktion zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in Säugetierzellen untersucht.

4.1. Klonierung von IIP-1 in bakterielle und eukaryotische Expressionsvektoren

Zunächst mußte IIP-1 in verschiedene Expressionsvektoren kloniert werden, um eine Expression in Bakterien und Säugetierzellen zu ermöglichen. Außerdem wurde eine partielle cDNS von p85 β (AC: Y13569, AS: 591-722) in diese Expressionsvektoren kloniert. p85 β sollte in den biochemischen ‘Assaysystemen’ als Positivkontrolle für eine Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor fungieren.

Klonierung von IIP-1 und p85b in den bakteriellen Expressionsvektor pGex:

Die kodierende Sequenz von IIP-1 und eine partielle p85 β -cDNS (s.o.) wurden über die *NotI*-Restriktionsschnittstelle aus dem 2-Hybrid-Fisch-Vektor VP-16 in den bakteriellen Expressionvektor pGex5x1 kloniert (pGex-IIP-1, pGex-p85). Damit konnten sowohl IIP-1 als auch p85 β als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in Bakterien exprimiert werden.

Klonierung von IIP-1 und p85b in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1flag

Die kodierende Sequenz von IIP-1 und die partielle p85 β -cDNS wurden desweiteren aus dem 2-Hybrid-Fisch-Vektor VP16 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1flag über die *NotI*-Restriktionsschnittstelle kloniert (pcDNAflag-IIP-1, pcDNAflag-p85). Damit konnten sowohl IIP-1 als auch p85 β mit einem N-terminalen ‘flag-Tag’ in Säugetierzellen exprimiert werden.

4.2. Interaktion zwischen gereinigtem IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in einem ‘GST-Pulldown-Assay’

Ein ‘GST-Pulldown-Assay’ wurde durchgeführt, um die Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor *in vitro* zu bestätigen. Dazu wurde die Bindung von bakteriell exprimiertem GST-IIP-1 an den IGF-1 Rezeptor, der in IGF-1-stimulierten oder unstimulierten I24 Zellen (IGF-1 Rezeptor-überexprimierende NIH3T3 Zellen) exprimiert wurde, untersucht (Abbildung 21). In der Tat konnte GST-IIP-1 an beide Formen des Rezeptors, die unphosphorylierte und die phosphorylierte, binden (Spur 1-2). Im Gegensatz dazu band GST-p85 β nur an die aktivierte Form des Rezeptors, nicht jedoch an die unphosphorylierte Form (Spur 3-4). Die Spezifität der Bindungsreaktionen wurde durch Verwendung von GST ohne Fusionspartner verifiziert (Spur 5-6).

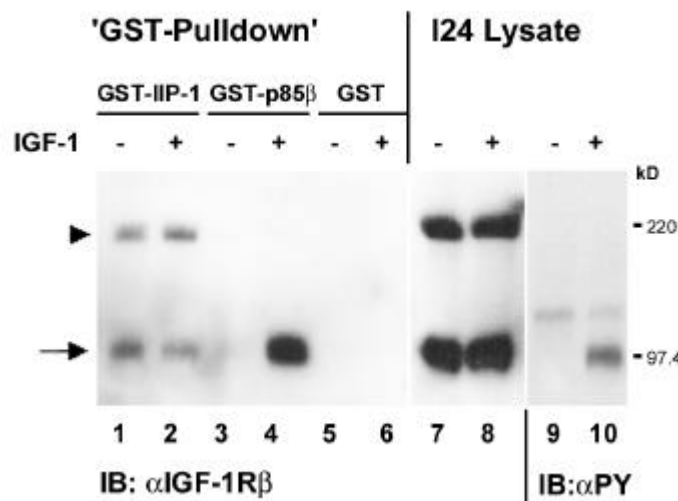


Abbildung 21: 'GST-Pulldown-Assay' zum Nachweis der Interaktion zwischen gereinigtem IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor *in vitro*. GST-IIP-1 präzipitiert den phosphorylierten und unphosphorylierten IGF-1 Rezeptor aus I24-Zellysaten (Spur 1-2). GST-p85 β interagiert mit dem stimulierten, jedoch nicht mit dem unstimulierten IGF-1 Rezeptor (Spur 3-4). GST alleine zeigt keine Bindung an den IGF-1 Rezeptor (Spur 5-6). GST-Fusionproteine, gebunden an Glutathion-Sepharose, wurden mit Lysaten von I24 Zellen, die mit serumfreiem Medium (0,1 % FKS, dialysiert) (Spur 1, 3, 5) oder mit IGF-1 stimuliert wurden (Spur 2, 4, 6), inkubiert. Die Präzipitate wurden mittels anti-IGF-1-R-Immunoblot analysiert. Zum Nachweis der Expression und Phosphorylierung des Rezeptors wurden die Gesamtzellysate mittels eines anti-IGF-1R- bzw. anti-Phosphotyrosin (PY)-Immunoblottes (Spur 7-8 bzw. 9-10) analysiert. Die Pfeilspitze und der Pfeil markieren das IGF-1 Rezeptor-Vorläufer-Protein bzw. die IGF-1 Rezeptor β -Untereinheit.

Das Ergebnis diese 'GST-Pulldown-Assays' zeigt deutlich, daß gereinigtes IIP-1 mit dem IGF-1 Rezeptor interagiert, wobei diese Interaktion Kinase-unabhängig ist.

4.3. Ko-Immunpräzipitation von IIP-1-IGF-1 Rezeptor-Komplexen aus Säugetierzellen

Um die Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor auch in Säugetierzellen verifizieren zu können, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente unter Verwendung von HEK 293 Zellen, in denen sowohl der IGF-1 Rezeptor als auch IIP-1 überexprimiert wurden, durchgeführt.

Dazu wurde der Expressionsvektor pcDNAflag-IIP-1 (bzw. als Kontrolle pcDNAflag-p85 β) zusammen mit einem Expressionsvektor, der für den Wildtyp IGF-1 Rezeptor bzw. für eine Kinase-inaktive Mutante kodiert (pRK5-1714 bzw. pRK5-1564) in HEK 293 Zellen ko-transfiziert. Proteinkomplexe, die ein flag-Fusionsprotein enthielten, wurden mittels flag-Agarose aus Lysaten dieser transfizierten Zellen präzipitiert und das Vorhandensein des IGF-1 Rezeptors in diesen Präzipitaten über einen anti-IGF-1 Rezeptor-Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 22A). IIP-1 interagierte in den 293-Transfektanten sowohl mit dem Wildtyp IGF-1 Rezeptor als auch mit der Kinase-inaktiven Mutante (Abbildung 22A, Spur 1-2). Damit konnten die Ergebnisse des 'GST-Pulldown-Assays' (4.2.) und der 2-Hybrid-Experimente (1.2.2.) auch in diesem experimentellen System bestätigt werden. Die Kontrolle p85 β band nur an den Wildtyp IGF-1 Rezeptor, jedoch nicht an die Kinase-inaktive Mutante (Abbildung 22A, Spur 3-4).

In 2-Hybrid-Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, daß IIP-1 nicht mit dem Insulin Rezeptor interagiert (1.2.3.). Dieses Ergebnis sollte in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten aus Säugetierzellen verifiziert werden. Dazu wurden HEK 293 Zellen mit pcDNAflag-IIP-1 bzw.

pcDNAflag-p85 β und einem eukaryotischen Expressionsvektor, der für den Insulin Rezeptor kodiert (pCMVIR), ko-transfiziert. Mit Lysaten dieser transfektierten HEK 293 Zellen wurden Immunpräzipitationsexperimente, wie oben beschrieben, durchgeführt (Abbildung 22B). Erwartungsgemäß konnten Proteinkomplexe, die den Insulin Rezeptor und p85 β enthielten (Abbildung 22B, Spur 2) aus den transfektierten Zellen präzipitiert werden, während keine Komplexe aus Insulin Rezeptor und IIP-1 (Abbildung 22B, Spur 1) nachweisbar waren. Das Ergebnis dieses Immunpräzipitationsexperimentes bestätigt eindeutig den Befund der 2-Hybrid-Experimente, daß IIP-1 nicht mit dem Insulin Rezeptor interagiert.

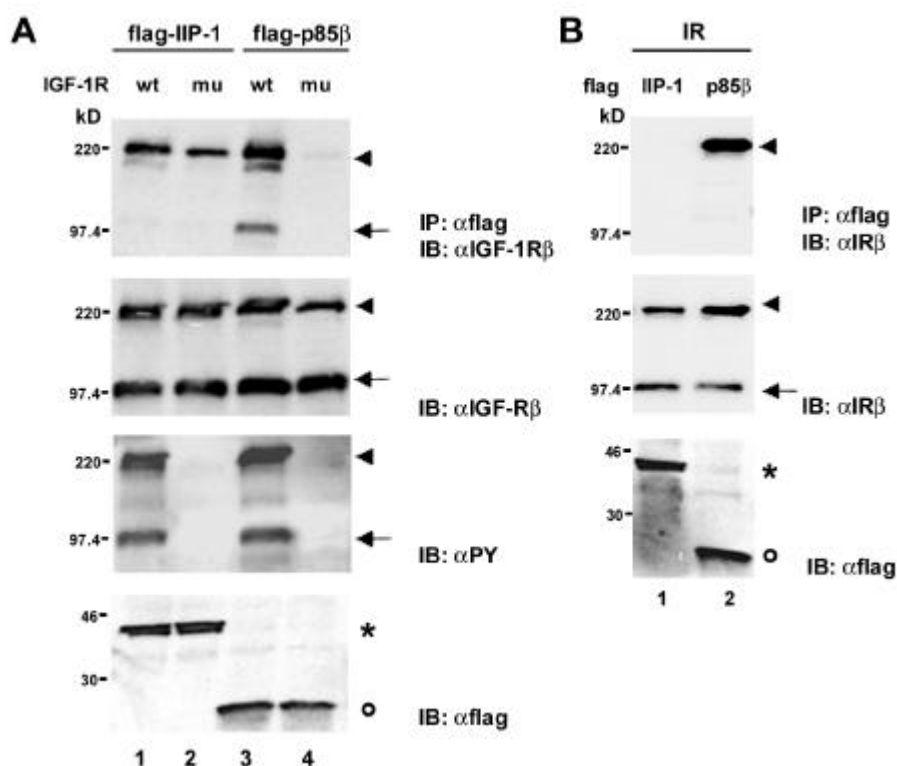


Abbildung 22: Ko-Immunpräzipitationsexperimente zum Nachweis der Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in HEK 293 Zellen. (A) Flag-IIP-1 präzipitiert den Wildtyp IGF-1 Rezeptor und eine Kinase-inaktive Mutante aus 293 Zellen (oberer Teil, Spur 1-2), p85 β assoziiert nur mit der Wildtyp Form des IGF-1 Rezeptors (oberer Teil, Spur 3-4). Lysate von 293 Zellen, die die jeweiligen Proteine überexprimierten, wurden mit anti-flag-Agarose gemischt und die Präzipitate mittels anti-IGF-1R-Immunoblot analysiert. Die Expression des IGF-1 Rezeptors wurde mittels eines anti-IGF-1R-Immunoblottes kontrolliert. Die IGF-1 Rezeptor-Antikörper wurden anschließend von dem Blot gewaschen. Der Blot wurde anschließend unter Verwendung eines anti-PY-Antikörpers analysiert, um die Phosphorylierung des Rezeptors zu verifizieren. Die Expression der flag-Fusionsproteine wurde mittels eines anti-flag-Immunoblottes kontrolliert. (B) Der Insulin Rezeptor wird von flag-p85 (oberer Teil, Spur 2), jedoch nicht von flag-IIP-1 (oberer Teil, Spur 1) aus 293 Zellen präzipitiert. Anti-flag-Immunpräzipitationsexperimente mit 293 Zellen, die flag-IIP-1 bzw. flag-p85 β und den Insulin Rezeptor überexprimieren, wurden wie in (A) beschrieben durchgeführt. Der Insulin Rezeptor wurde in diesen Präzipitaten durch einen anti-Insulin-Rezeptor-Immunoblot nachgewiesen. Die Expression von Insulin Rezeptor und flag-Fusionsproteinen wurde mittels anti-Insulin Rezeptor- bzw. anti-flag-Immunoblot nachgewiesen. Die Pfeilspitze markiert die Position des IGF-1 Rezeptors- (A) bzw. des Insulin Rezeptor-Vorläuferproteins (B), der Pfeil die Position der β -Untereinheit des IGF-1 Rezeptors. Der Stern und der Kreis markieren die Position der Fusionsproteine flag-IIP-1 bzw. flag-p85 β .

Diese Experimente demonstrieren, daß IIP-1 in Säugetierzellen spezifisch und Kinase-unabhängig mit dem IGF-1 Rezeptor jedoch nicht mit dem Insulin Rezeptor interagiert.

5. Expressionsstudien zu IIP-1

5.1. Expressionsstudien auf mRNA-Ebene

Zunächst wurde die Expression des IIP-1-Transkriptes in humanen Geweben mittels ‘Northern Blot’ untersucht. Dazu wurde ein bereits fertiger ‘Multiple Tissue mRNA Filter’ mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten IIP-1-spezifischen Sonde, die die gesamte cDNS abdeckte, hybridisiert. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis dieses ‘Multiple Tissue Northern Blottes’. Das ca. 1,8 kb große IIP-1 Transkript konnte in fast allen hier untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise zeigten periphere Blutlymphozyten (PBLs) keine detektierbare Expression des Transkriptes. In Herz, Skelettmuskel, Kolon, Niere und Plazenta ist eine starke Expression der IIP-1-mRNA zu beobachten, während in Gehirn, Thymus, Milz, Leber, Dünndarm und Lunge wesentlich niedrigere mRNA-Spiegel festgestellt wurden.

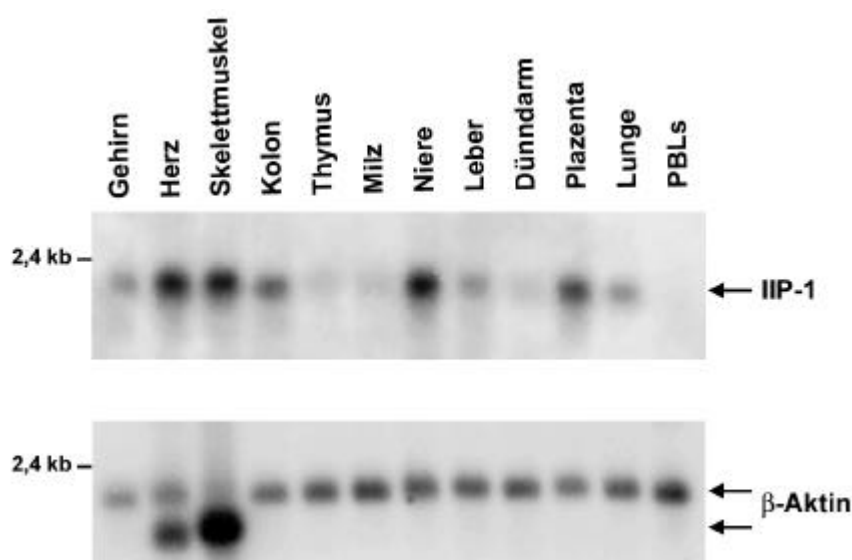


Abbildung 23: ‘Multiple Tissue Northern Blot’ zur Untersuchung der IIP-1 Expression in normalen humanen Geweben. Ein ‘Multiple Tissue mRNA Filter’ wurde mit einer DIG-markierten IIP-1-Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der Blot gestrippt und anschließend mit einer β -Aktin-spezifischen Sonde hybridisiert.

Mittels des ‘Multiple Tissue Northern Blottes’ konnte ein breites Expressionsspektrum des IIP-1 Transkriptes in humanen Geweben nachgewiesen werden. Es wurde weitergehend noch ein ‘Multiple Tissue Expression (MTE) Array’, auf dem mRNA von einer noch größeren Anzahl von humanen Geweben – und auch Zelllinien – punktuell aufgetragen ist, mit der DIG-markierten IIP-1-Sonde hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 dargestellt. Es ist erkennbar, daß das IIP-1-Transkript nicht nur in sehr vielen adulten Geweben, sondern auch in allen untersuchten fötalen Geweben (Spalte 11) detektierbar ist. Das Expressionsmuster von IIP-1 in adulten Geweben, das sich aus diesem ‘MTE-Array’ ergibt, bestätigt weitestgehend die Daten des ‘Multiple Tissue Northern Blottes’. Die IIP-1-mRNA wird in allen untersuchten Teilen des Gehirns und im Rückenmark exprimiert (Spalte 1-3). Ebenso konnte eine Expression der IIP-1-mRNA in allen analysierten Bereichen des Herzens (Spalte 4) und des Magen-Darm-Traktes (Spalte 5-6) festgestellt werden. Die lymphatischen Organe zeigen

jedoch eine unterschiedlich starke Expression von IIP-1. Während Milz (C7), Thymus (D7) und Lymphknoten (F7) die IIP-1-mRNS exprimieren, ist eine Expression von IIP-1 in peripheren Blutlymphozyten (E7) nicht detektierbar. Auch die untersuchten Blutkrebs-Zelllinien exprimieren IIP-1 unterschiedlich stark. Die Leukämie-Zelllinie HL-60 (A10) sowie die Burkitt's-Lymphoma-Zelllinien Raji und Daudi (E10, F10) exprimieren das IIP-1-Transkript nicht bzw. nur so schwach, daß es nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu kann in den Leukämie-Zelllinien K-562 und MOLT-4 die IIP-1-mRNS detektiert werden.

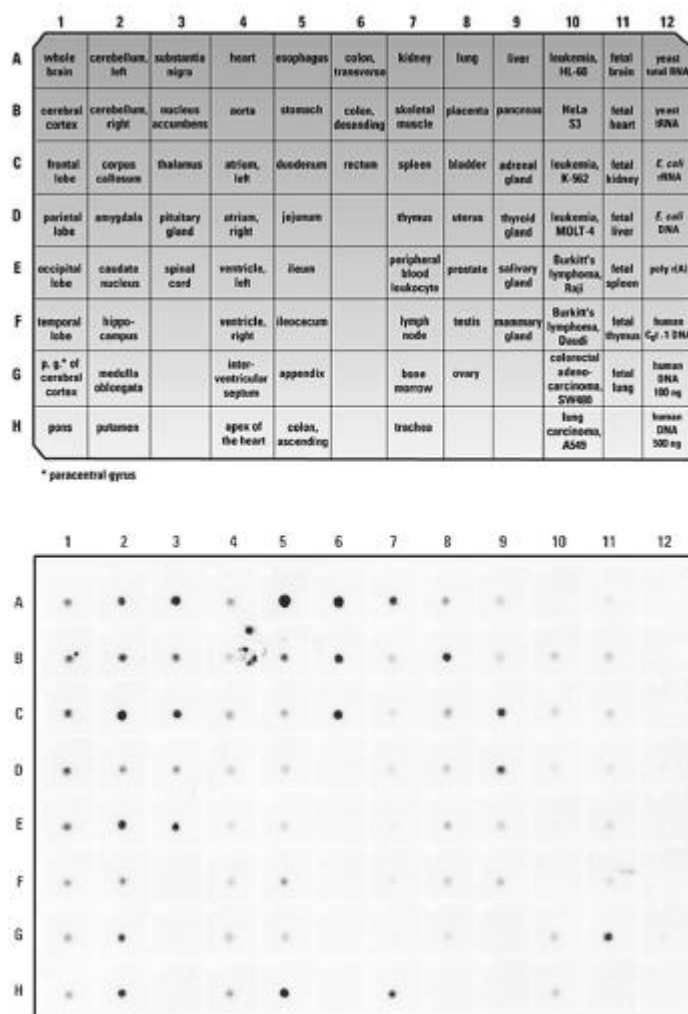


Abbildung 24: 'Multiple Tissue Expression Array' zum Nachweis der IIP-1 Expression in humanen Geweben. Der 'Multiple Tissue Expression Array' wurde mit einer DIG-markierten IIP-1-Sonde hybridisiert.

5.2. Expressionsstudien auf Protein-Ebene

5.2.1. Gewinnung eines polyklonalen anti-IIP-1-Antiserums

Um eine Möglichkeit des direkten Nachweises des IIP-1-Proteins zu erhalten, wurde ein polyklonales Serum in Kaninchen hergestellt. Als Immunogen diente bakteriell exprimiertes, gereinigtes GST-IIP-1. Das Serum wurde über einen ELISA-Test auf IIP-1-spezifische Antikörper analysiert. Nach der

Aufreinigung der IgGs wurden diese mittels eines Immunoblottes auf das Vorhandensein IIP-1-spezifischer Antikörper getestet. Dazu wurden zunächst Lysate von untransfektierten HEK 293 Zellen bzw. HEK 293 Zellen, die mit dem unter 4.3. erwähnten pcDNAflag-IIP-1 Konstrukt transfektiert waren, und ein Lysat von Raji-Lymphomzellen hergestellt. Diese Lysate wurden in einem Immunoblot mit dem aufgereinigten anti-IIP-1-Serum, mit anti-flag Antikörpern bzw. mit dem Prä-Immunsersum (PS) analysiert (Abbildung 25). In Lysaten von transfektierten (Spur 1) und untransfektierten Zellen (Spur 2) erkennt das anti-IIP-1 Antiserum ein etwa 40 kD-Protein, was ca. dem errechneten Molekulargewicht von IIP-1 (36 kD) entspricht. Daß es sich bei diesem Protein tatsächlich um rekombinantes flag-IIP-11 (Spur 1) bzw. endogenes IIP-1 (Spur 2) handelt, wird durch den Befund unterstützt, daß eine Bande auf der gleichen Höhe in dem anti-flag-Immunoblot des Lysates von flag-IIP-1-überexprimierenden HEK 293 Zellen zu erkennen ist (Spur 4). Wie zu erwarten, kann das anti-IIP-1-Serum in einem Immunoblot des Raji-Lymphomzell-Lysates dagegen keine Bande auf der Höhe von 40 kD detektieren (Spur 3). Diese Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet, da sie im 'MTE-Array' (Abbildung 24) durch eine nicht-detektierbare Expression des IIP-1-Transkriptes aufgefallen waren.

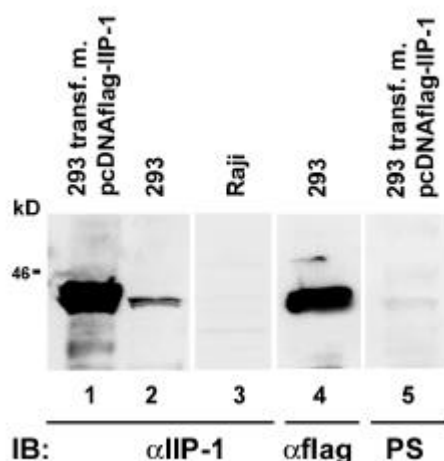


Abbildung 25: Evaluierung des anti-IIP-1-Antiserums in Immunoblot-Experimenten. Das IIP-1-Antiserum erkennt spezifisch ein 40 kD-Protein im Immunoblot eines Lysates von untransfektierten HEK 293 Zellen (Spur 2) oder HEK 293 Zellen, die mit pcDNAflag-IIP-1 transfektiert wurden (Spur 1). Der anti-flag-Antikörper detektiert ein Protein auf der gleichen Höhe in einem Immunoblot des Lysates der HEK 293-Transfektanten (Spur 4), während das Prä-Immunsersum (PS) keine Bande erkennt (Spur 5). Der anti-IIP-1-Immunoblot eines Lysates von Raji-Zellen zeigt ebenfalls kein Signal auf der entsprechenden Höhe (Spur 3). Es wurden jeweils 50 µg Gesamtzellprotein aufgetragen.

Diese Immunoblot-Analysen lassen also deutlich erkennen, daß das polyklonale anti-IIP-1-Antiserum spezifisch für IIP-1 ist.

5.2.2. Nachweis der Ko-Expression von IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in humanen Tumorzelllinien und Normalzellen

Um einen Hinweis auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen zwei Proteinen zu erhalten, wird oftmals das Expressionsmuster beider Proteine in verschiedenen Geweben und Zelltypen analysiert.

Zur Untersuchung einer Ko-Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor wurde die Expression von IIP-1 in verschiedenen humanen Krebszelllinien und in Normalzellen mittels Immunoblot analysiert und mit

der Expression des IGF-1 Rezeptors verglichen. Immunoblot-Analysen von Lysaten dieser Zellen (unter Verwendung von anti-IIP-1-Antiserum und anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper) zeigten, daß sowohl IIP-1 als auch der IGF-1 Rezeptor in vielen adhären und nicht-adhären Zellen exprimiert ist (Abbildung 26), wobei auffällt, daß die Stärke der Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in den verschiedenen Zelltypen korreliert. Tumorzelllinien und Normalzellen, die IIP-1 stark exprimieren wie die Melanom-Zelllinie G361 (Spur 1), die Adenokarzinom-Zelllinien SW480 und MCF-7 (Spur 2-3) oder normale Brustepithelzellen (HMEC), normalen Lungenepithelzellen (SAEC) (Spur 3-4) und Keratinozyten (Spur 11) weisen auch eine starke Expression des IGF-1 Rezeptors auf. Im Gegensatz dazu zeigen die T-Zell-Leukämie-Zelllinie MOLT-3 und die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi (Spur 4-5) wie auch die HUVEC-Endothelzellen und humane Fibroblasten eine schwache Expression von IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor. In der promyelozytären Leukämie-Zelllinie HL-60 (Spur 6) und in peripheren Blutlymphozyten (Spur 12) ist die Expression beider Proteine äußerst niedrig.

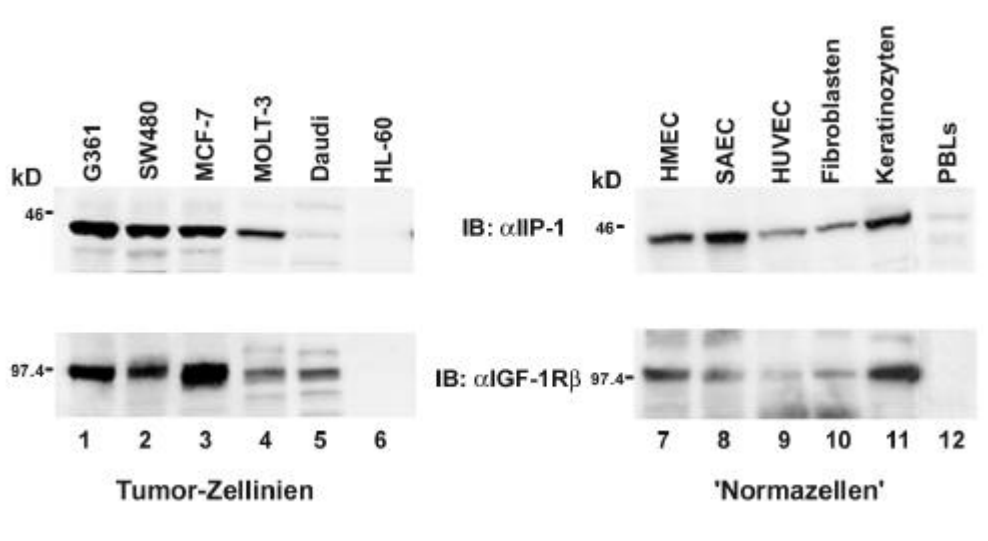


Abbildung 26: Immunoblot-Analyse von Krebszelllinien und normalen Zellen zur Untersuchung der Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor. 40 µg Gesamtzelllysate der verschiedenen Krebszelllinien und Normalzellen wurde mittels anti-IIP-1- und anti-IGF-1 Rezeptor-Immunoblot analysiert.

Aus diesen Immunoblot-Analysen geht deutlich hervor, daß die Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in vielen verschiedenen Zelltypen korreliert. Es ist anzunehmen, daß diese Ko-Expression auf eine Ko-Regulation der Expression auf Transkriptions- oder Translationsebene zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigen Zellen epithelialer Herkunft eine höhere Expression beider Proteine als andere Zelltypen.

5.2.3. Ko-Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in MCF-7 Zellen

Für eine funktionelle Interaktion zwischen IIP-1 und dem Membran-assoziierten IGF-1 Rezeptor ist die zelluläre Ko-Lokalisation beider Proteine eine essentielle Voraussetzung. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Lokalisation von IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in MCF-7 Zellen untersucht, die mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNAflagIIP-1 (4.1.) transfektiert worden waren.

Da sich in Vorversuchen herausstellte, daß der monoklonale anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper Ab-1 für die Detektion des IGF-1 Rezeptors in fixierten Zellen am besten geeignet war, konnte für die Detektion des in den transfektierten MCF-7-Zellen überexprimierten flag-IIP-1 bei Ko-Färbungen nicht mehr der monoklonale anti-flag M2 Antikörper verwendet werden, sondern es mußte auf das polyklonale anti-IIP-1-Antiserum zurückgegriffen werden. Daher wurde zunächst die Eignung dieses Serums für Immunfluoreszenz-Analysen getestet. Dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der flag-IIP-1-überexprimierenden MCF-7 Zellen mit anti-IIP-1-Antiserum und dem anti-flag-Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 27 zu sehen, unterscheidet sich das Signal, das durch das anti-IIP-1-Antiserum erzeugt wurde (rote Färbung) nicht von dem Signal des anti-flag-Antikörpers (grüne Färbung). Es ist jedoch anzumerken, daß es mit dem anti-IIP-1-Antiserum kaum möglich ist, endogenes IIP-1, dessen Expression in MCF-7 Zellen mittels Immunoblot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 26), zu detektieren.

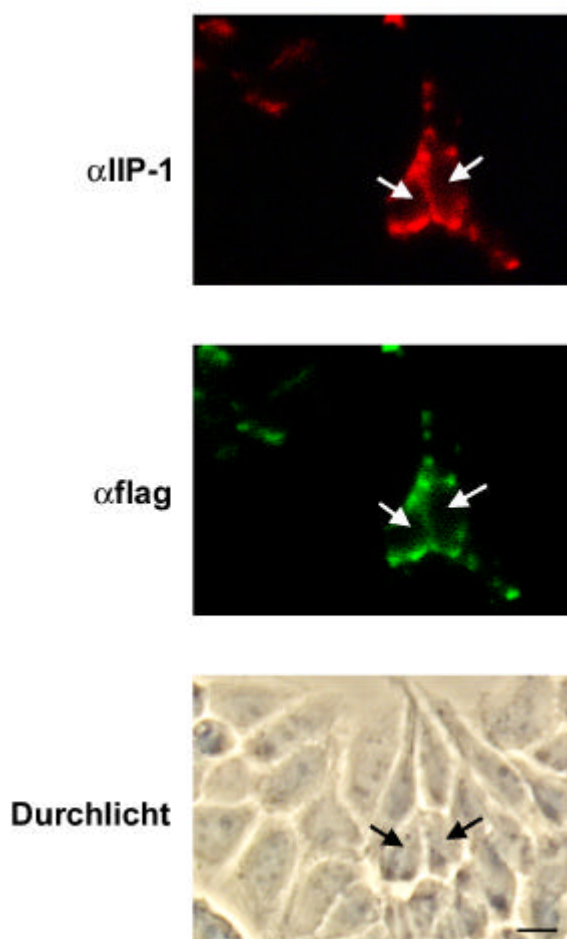


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung von flag-IIP-1-überexprimierenden MCF-7-Zellen zur Evaluierung der Spezifität des anti-IIP-1-Antiserums. Das Fluoreszenzsignal, das mit dem anti-IIP-1-Antiserum erzeugt wird (rot), stimmt mit dem anti-flag-Fluoreszenzsignal (grün) überein. MCF-7 Zellen, die mit pcDNAflag-IIP-1 transfektiert worden waren, wurden mittels einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von anti-IIP-1-Antiserum und anti-flag-Antikörpern analysiert. Die Pfeile markieren transfektierte Zellen. Der Balken entspricht 20 µm.

Mittels dieses Vorversuches konnte gezeigt werden, daß das anti-IIP-1-Antiserum für Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen geeignet ist. Daher wurden im folgenden MCF-7-Zellen, die transient das flag-IIP-1-Fusionsprotein überexprimierten, mittels einer Ko-Färbung unter Verwendung

von anti-IIP-1-Antiserum und anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper Ab-1 analysiert. Wie zu erwarten, konnte der IGF-1 Rezeptor in dieser Immunfluoreszenz-Färbung an der Zellmembran nachgewiesen werden (Abbildung 28, rote Färbung). IIP-1 wurde im Zytoplasma, v.a. in Membran-nahen Bereichen detektiert (grüne Färbung). In nicht-transfektierten Zellen konnte endogenes IIP-1 kaum nachgewiesen werden, während transfizierte Zellen eine starke Färbung von rekombinantem IIP-1 zeigten.

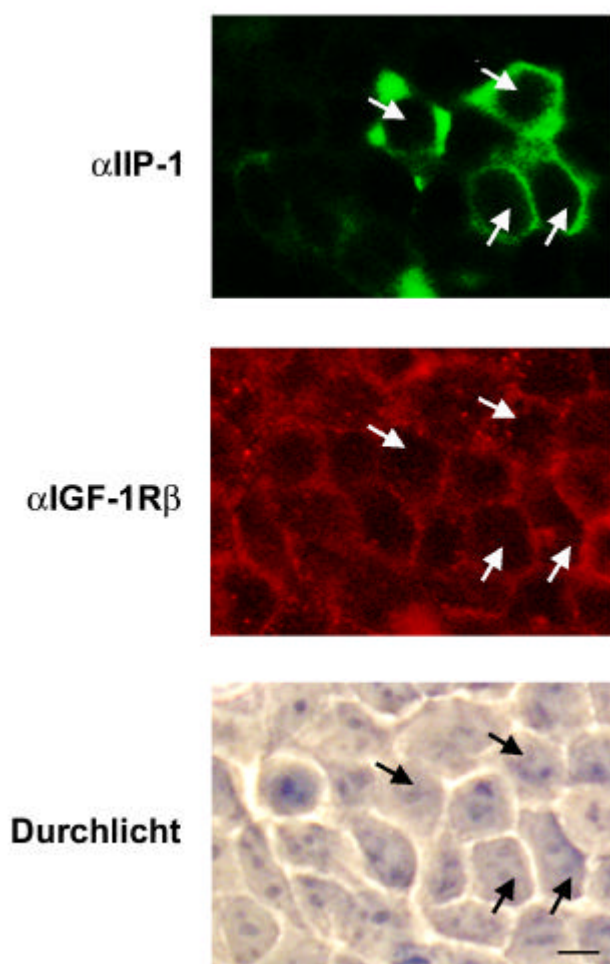


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7 Zellen zum Nachweis der Ko-Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor. IIP-1 Expression kann in Membran-nahen Regionen des Zytoplasmas detektiert werden, wobei diese Lokalisation mit der Membran-assoziierten Lokalisation des IGF-1 Rezeptors überlappt. MCF-7 Zellen, die mit pcDNAflag-IIP-1 transfiziert worden waren, wurden mittels einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von anti-IIP-1-Antiserum und anti-IGF-1 Rezeptor-Antikörper (Ab-1) analysiert. Die Pfeile markieren transfizierte Zellen. Der Balken entspricht 20 µm.

Die überlappende Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in Membran-nahen Bereichen von MCF-7 Zellen ist ein weiterer Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang beider Proteine

6. Zellbiologische Untersuchungen zu IIP-1

Um die in verschiedenen experimentellen Systemen nachgewiesene Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor auf ihre funktionelle Bedeutung in eukaryotischen Zellen zu untersuchen, wurden stabile MCF-7-IIP-1-Transfektanten generiert. Diese stabilen MCF-7 Zellen wurden in Bezug auf ihr

Verhalten in IGF-1-vermittelten Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptoseschutz und Migration analysiert.

6.1. Tetracyclin-induzierbare Expression von IIP-1 in MCF-7 Zellen

Zur stabilen Überexpression von IIP-1 in MCF-7 Zellen wurde das tet-on-System der Firma Clontech verwendet. Mittels dieses Systems ist es möglich, die Expression des stabil transfektierten Proteins durch Zugabe von Tetracyclin bzw. des stabileren Tetracyclin-Derivates Doxycyclin zu induzieren. Dieses System hat den Vorteil, daß der gleiche stabile Klon in An- und Abwesenheit des transfektierten Proteins untersucht werden kann, so daß klonale Effekte ausgeschlossen werden können. Für die Etablierung des tet-on-Systems sind zwei Transfektionsschritte notwendig. Zuerst muß ein Vektor (pTet-on), der für den 'reversen Tet-Repressor' kodiert, stabil in die Zellen transfiziert werden. Bei dem 'reversen Tet-Repressor' handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der nur in Anwesenheit von Tetracyclin an seine DNS-Bindungssequenz, das 'Tetracyclin-Response-Element', binden und die Transkription des am 3'-Ende dieses Promoter-Elementes vorhandenen offenen Leserahmens aktivieren kann. In einem zweiten Transfektionsschritt wird ein Expressionsvektor (pTre), der für das zu untersuchende Protein unter der Kontrolle des 'Tetracyclin-Response-Element' kodiert, in die den 'reversen Tet-Repressor' überexprimierenden Zellen stabil transfiziert. Eine Expression des zu untersuchenden Proteins kann dann nur in Anwesenheit von Tetracyclin erfolgen, da der 'reverse Tet-Repressor' nur dann die Transkription der entsprechenden cDNS induzieren kann.

6.1.1. Klonierung von IIP-1 in den eukaryotischen Expressionsvektor pTre

Die IIP-1-cDNS wurde einschließlich der für den 'flag-Tag' kodierenden Sequenz mittels PCR aus pcDNAflag-IIP-1 (siehe 4.1.) in den Vektor pTre 3' des 'Tetracyclin-Response-Elementes' kloniert. In der PCR wurden die Oligonukleotide 'Tre-IIP-1-sense' und 'Tre-IIP-1-reverse' verwendet, mittels derer am 5'-Ende eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurden, so daß das PCR-Fragment nach entsprechendem Restriktionsverdau in pTre kloniert werden konnte. Das resultierende Plasmid wurde als pTreflag-IIP-1 bezeichnet

6.1.2. Stabile Transfektion von pTreflag-IIP-1 in MCF-7 Zellen

pTreflag-IIP-1 wurde zusammen mit dem Selektionsplasmid pcDNAHygro, das für die HygromycinB-Resistenz kodiert, in schon mit pTet-on stabil transfizierte MCF-7-Zellen (tet-MCF-7) transfiziert. Nach zwei Tagen wurde der Selektionsmarker HygromycinB (0,2 mg/ml) zugesetzt. Nach etwa zwei Wochen waren Einzelkolonien (ca. 60) sichtbar, von denen 41 isoliert wurden, die bis zu ausreichenden Zellzahlen propagiert wurden. Zur Überprüfung der Tetracyclin-Induzierbarkeit der IIP-1 Expression wurden die Klone im folgenden mit bzw. ohne Doxycyclin (1 µg/ml) für 24 Stunden kultiviert und Zellysate hergestellt. Diese Lysate wurden mittels anti-flag-Immunoblot untersucht. Eine repräsentative Auswahl von 11 Klonen ist in Abbildung 29 (oberer Teil) gezeigt. Es ist zu erkennen, daß zum einen Klone selektioniert wurden, die sowohl eine Induzierbarkeit der flag-IIP-1-Expression in Anwesenheit von Doxycyclin als auch eine Repression der Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zeigen (Klon 1-6 und Klon 8). Diese Klone sind für weitere Untersuchungen sehr gut geeignet. Zum anderen gibt es jedoch auch Klone, in denen die Expression von IIP-1 entweder nicht

mit Doxycyclin induziert (Klon 7, 9, 11) oder ohne Doxycyclin reprimiert (Klon 10) werden kann. Diese Klone wurden nicht weiter untersucht.

Mittels dieser Immunoblot-Analyse konnten von den 41 isolierten Klonen 27 als negativ und 14 als positiv bewertet werden. Von den 27 negativen Klonen zeigten 22 keine Induktion der flag-IIP-1 Expression in Anwesenheit von Doxycyclin und 5 keine Repression der Expression in Abwesenheit des Antibiotikums.

Um die Expressionsstärke des rekombinanten flag-IIP-1 mit der des endogenen IIP-1 in den transfizierten Zellen vergleichen zu können, wurden die Zellysate der oben erwähnten 11 Klone auch in einem anti-IIP-1-Immunoblot analysiert (Abbildung 29, unterer Teil). Dabei ist zu erkennen, daß die Expression des rekombinanten flag-IIP-1 in den positiven Klonen etwa drei- bis fünfmal so stark ist wie die Expression des endogenen Proteins, wobei sich die einzelnen Klone in ihrer Expressionsstärke unterscheiden. So ist die Expression von flag-IIP-1 in Klon 1 und 3 wesentlich schwächer als in den Klonen 2, 4, 5, 6 und 8. Diese Klone zeigen eine etwa gleich starke Expression von rekombinantem flag-IIP-1.

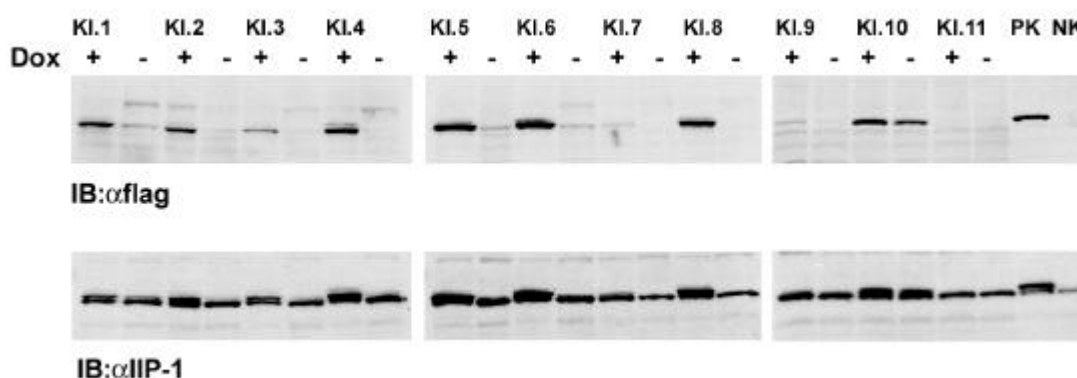


Abbildung 29: Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Expression von flag-IIP-1 in MCF-7-Transfektanten. Stabile IIP-1-Transfektanten wurden für 24 Stunden mit (+) bzw. ohne (-) Doxycyclin (Dox) kultiviert und anschließend lysiert. Je 40 µg des Gesamtzellproteins wurden einem anti-flag- bzw. anti-IIP-1-Immunoblot unterzogen, wobei als Negativkontrolle (NK) pTet-on-MCF-7-Transfektanten (tetMCF-7) und als Positivkontrolle (PK) HEK 293 Zellen dienten, die transient mit pcDNAflag-IIP-1 transfiziert worden waren.

6.2. Untersuchungen zur IGF-1-abhängigen Proliferation

Der Einfluß einer IIP-1-Überexpression auf das IGF-1-abhängige Proliferationsverhalten von MCF-7 Zellen wurde mittels eines Proliferationstestes untersucht. In Abbildung 30 ist das Ergebnis eines solchen Proliferationstestes für die tetMCF-7/IIP-1 Klone 4 und 8 und für den Kontrollklon tetMCF-7, der lediglich mit dem pTet-on Vektor transfiziert ist und als Ausgangsklon für die Transfektion von pTreflag-IIP-1 diente, dargestellt. Durch Zugabe von IGF-1 konnte die Proliferation der IIP-1 Transfektanten und des Kontrollklons um ca. 50 % bis 60 % gesteigert werden. Eine durch Doxycyclin induzierte IIP-1 Expression beeinflusst jedoch nicht die IGF-1-abhängige Proliferation dieser Klone.

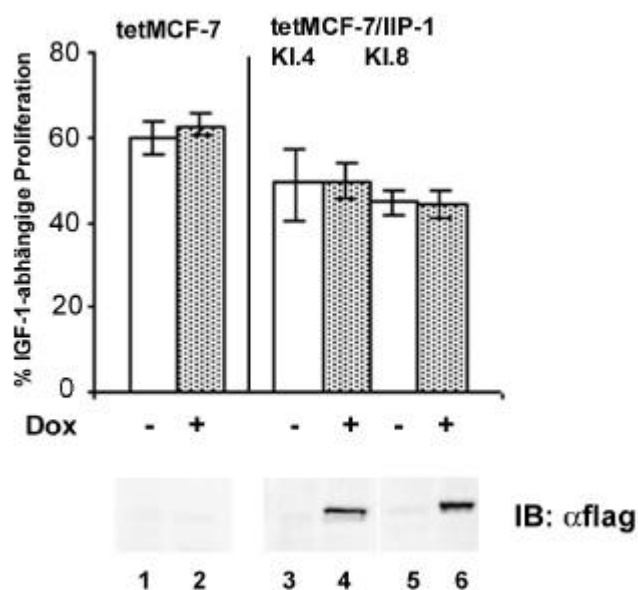


Abbildung 30: Analyse des IGF-1-abhängigen Proliferationsverhalten von MCF-7/IIP-1-Transfektanten. Eine durch Doxycyclin induzierte IIP-1-Überexpression beeinflusst nicht die durch IGF-1 stimulierte Proliferation von MCF-7-Zellen. In serumfreiem Medium (0,1 % FKS, dialysiert) synchronisierte tetMCF-7-IIP-1-Transfektanten (tetMCF7/Kl.4, Kl.8) und der tetMCF-7-Ausgangsklon (tetMCF7) wurden in der An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) mit 10^{-8} M IGF-1 stimuliert. Nach 48 Stunden wurde ein WST-1-Proliferationstest durchgeführt. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), das in zwei weiteren Experimente reproduziert werden konnte. Die Induktion der Expression von IIP-1 durch die Zugabe von Doxycyclin wurde mittels eines anti-flag-Immunoblottes kontrolliert, wobei jeweils 40 µg Gesamtzellprotein getestet wurden.

Außerdem wurde der Einfluß der IIP-1-Überexpression auf IGF-1-induzierten Apoptoseschutz nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin untersucht. Auch in diesem 'Assay' konnte kein IIP-1 abhängiger Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

6.3. Untersuchungen zur Motilität von MCF-7 Zellen

Neben Proliferation und Apoptoseschutz als zelluläre Effekte des IGF-1 Rezeptors wurde auch das Migrationsverhalten von MCF-7 Zellen bei einer Überexpression von IIP-1 untersucht. Dazu wurden tetMCF-7/IIP-1 Transfektanten in einer 'Transwell-Kammer' unter Zusatz von 20 % FCS in der unteren Kammer untersucht, wobei die Expression von IIP-1 in der Anwesenheit von Doxycyclin induziert und in der Abwesenheit von Doxycyclin reprimiert wurde. Wie in Abbildung 31 zu erkennen, migrieren ohne Doxycyclin-Zugabe etwa 15-20 % der Zellen innerhalb von 72 Stunden durch die Membran. Wird jedoch die Expression von IIP-1 in den Transfektanten durch Doxycyclin-Zugabe induziert, vermindert sich die Motilität der Zellen um ca. 30-50 %. Dies konnte für mehrere IIP-1-Klone gezeigt werden, wobei hier Klon 4 und Klon 8 dargestellt sind. Die Motilität des Kontrollklons tetMCF-7 bleibt dagegen durch die Zugabe von Doxycyclin unbeeinflusst. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß eine IIP-1-Überexpression zu einer verminderten Motilität von MCF-7 Zellen führt. Daraus läßt sich schließen, daß IIP-1 Mechanismen, die zu einer Migration von Zellen führen und an denen auch das IGF-1-Signaltransduktionssystem beteiligt ist, beeinflusst.

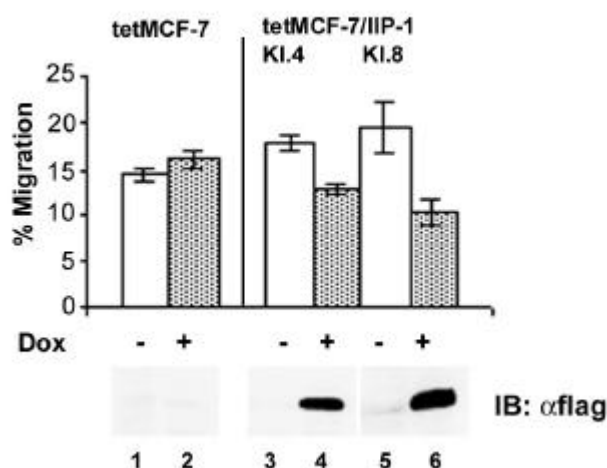


Abbildung 31: Analyse der Migration von MCF-7/IIP-1-Transfektanten. Eine durch Doxycyclin induzierte IIP-1-Überexpression reduziert die Motilität von MCF-7-Zellen. tetMCF-7/IIP-1-Transfektanten (Klon 4, 8) und der tetMCF-7-Ausgangsklon wurden in Transwells in serumfreiem Medium (0,1 % FKS, dialysiert) in der An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) ausgesät, wobei das Medium in der unteren Kammer mit 20 % FCS supplementiert wurde. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl an migrierten Zellen (untere Kammer) und an nicht-migrierten Zellen (obere Kammer) quantifiziert. Die Migration ist angegeben als prozentualer Anteil der Anzahl an migrierten Zellen an der Anzahl der insgesamt eingesetzten Zellen. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), das in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden konnte. Die Induktion der Expression von IIP-1 durch die Zugabe von Doxycyclin wurde mittels eines anti-flag-Immunoblottes kontrolliert, wobei jeweils 40 µg Gesamtzellprotein getestet wurden.

6.4. Untersuchungen zur IGF-1-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinasen

Die MAP-Kinasen sind Elemente der Signaltransduktionskaskaden, die IGF-1-induzierte zelluläre Effekte vermitteln (siehe *Einleitung*). Daher war es von Interesse, zu untersuchen, ob eine IIP-1-Überexpression die Aktivierung der ERK-1 und ERK-2-Kinasen durch IGF-1 beeinflusst.

Flag-IIP-1-überexprimierende MCF-7-Transfektanten wurden in serumfreiem Medium (0,1 % dialysiertes FKS) mit bzw. ohne Doxycyclin synchronisiert (24 Stunden) und nach 24 Stunden für zehn Minuten mit IGF-1 (10^{-8} M) stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Die Aktivierung, d.h. Phosphorylierung, der beiden ERK-Kinasen wurde mittels Immunoblot der Zellysate unter Verwendung von Antikörpern, die jeweils nur die phosphorylierte Form der Kinasen erkennen, untersucht. Wie in Abbildung 32 zu erkennen, werden durch IGF-1-Behandlung beide ERK-Kinasen sowohl in dem Kontrollklon tetMCF-7 als auch in den IIP-1-Transfektanten aktiviert (linker Teil der Abbildung), während im gehungerten Zustand diese Kinasen nicht aktiviert sind (rechter Teil der Abbildung). Allerdings fällt auf, daß die durch Doxycyclin induzierte Überexpression von IIP-1 in den Klonen 4 und 8 zu einer verminderten Phosphorylierung der ERK-Kinasen führt (Vergleich: Spur 1, 2 mit Spur 4, 5), während die Aktivierung der ERK-Kinasen in dem Kontrollklon tetMCF-7 unbeeinflusst von einer Doxycyclin-Zugabe bleibt (Vergleich: Spur 3 mit Spur 6).

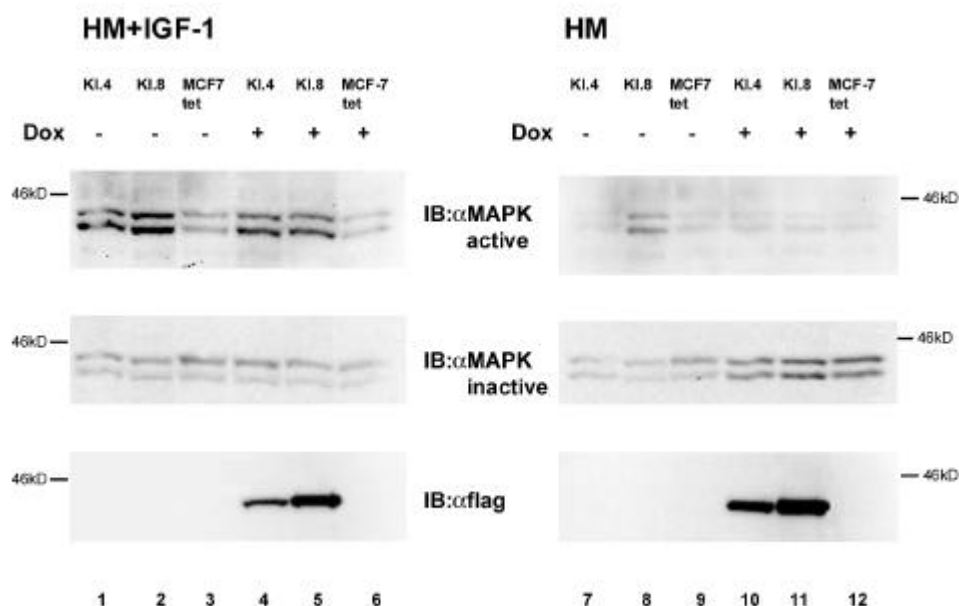


Abbildung 32: Immunoblot-Analyse IGF-1-stimulierter MCF-7/IIP-1 Transfektanten zur Untersuchung des Einflusses von IIP-1 auf die ERK-Aktivierung. Eine durch Doxycyclin induzierte IIP-1-Überexpression inhibiert die Phosphorylierung der ERK-Kinasen in MCF-7 Zellen (Vergleich Spur 1 mit 4, 2 mit 5, 3 mit 6). *tet*MCF-7/IIP-1 Transfektanten (Klon 4 und Klon 8) und der Kontrollklon *tet*MCF-7 wurden in serumfreiem Medium (0,1 % FKS, dialysiert) synchronisiert, nachdem die IIP-1-Expression 24 Stunden vorher durch Doxycyclinzugabe (1 µg/ml) induziert bzw. in der Abwesenheit von Doxycyclin reprimiert worden war. Nach der Synchronisationsphase wurden die Zellen für 10 Minuten mit IGF-1 (10^{-8} M) behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden anschließend lysiert und je 40 µg des Gesamtproteins in Immunoblots mit folgenden Antikörpern untersucht: 'anti-MAPK-active', der nur die phosphorylierte Form von ERK-1 (42 kD) und -2 (44 kD) erkennt, und als Expressionskontrolle für die ERK-Kinasen 'anti-MAPK', der gegen ein nicht-phosphoryliertes Epitop der ERK-Kinasen gerichtet ist. Außerdem wurde die Induktion der flag-IIP-1-Expression durch Doxycyclin mittels eines anti-flag-Immunoblottes überprüft.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Überexpression von IIP-1 eine durch IGF-1-induzierte Aktivierung von ERK1/2 negativ beeinflusst und zu einer schwächeren Phosphorylierung dieser Kinasen führt.

7. IIP-10

IIP-10 wurde in dem '2-Hybrid-Screen' der Jurkat-cDNS-Bibliothek als IGF-1 Rezeptor-interagierendes Protein identifiziert und zeigte in anschließenden 2-Hybrid-Untersuchungen keine Interaktion mit dem dem IGF-1 Rezeptor sehr verwandten Insulin Rezeptor (1.2.3.). Dies war ein erster Hinweis darauf, daß IIP-10 wie IIP-1 ein IGF-1 Rezeptor-spezifisches Bindeprotein ist.

7.1. Klonierung von IIP-10

Da der in dem '2-Hybrid-Screen' isolierte IIP-10-cDNS-Klon nicht für die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins kodiert (siehe 1.2.2.), wurde für weitere Untersuchungen die 'vollständige cDNS' von IIP-10, die mittlerweile auch in der EMBL Datenbank veröffentlicht ist (AC: AF161493) mittels PCR kloniert. Als 'Template' konnte ein cDNS-Klon verwendet werden, der in einem 'Differential Display'-Ansatz von primären Knochenzellen, die mit Vitamin C, D und K stimuliert worden waren, isoliert wurde. Als 5'- und 3'-Oligonukleotide wurden 'IIP-10-sense' und

‘IIP-10-reverse‘ eingesetzt, die mit der IIP-10-cDNS (AC: AF161493) an folgenden Stellen hybridisieren:

‘IIP-10-sense’: nt 447-463

‘IIP-10-reverse’: nt 1104-1124

Damit wurde in der PCR-Reaktion exakt die kodierende Sequenz von IIP-10 (nt 447-1124) amplifiziert. Über die Oligonukleotide wurden am 5‘- und am 3‘-Ende *NotI*-Restriktionsschnittstellen eingeführt, so daß das PCR-Fragment nach entsprechendem Restriktionsverdau in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNAflag kloniert werden konnte (pcDNAflag-IIP-10).

7.2. Lokalisation von IIP-10 in IGF-1 Rezeptor-überexprimierenden NIH3T3 Zellen

Um die zelluläre Lokalisation von IIP-10 zu bestimmen, wurde zunächst flag-IIP-10 in I24 Zellen (IGF-1 Rezeptor-überexprimierende NIH3T3 Zellen) überexprimiert und diese Zellen mittels anti-flag-Immunfluoreszenz-Färbung untersucht (Abbildung 33). Diese Färbung zeigte eindeutig, daß IIP-10 im Kern der transfizierten Zellen lokalisiert ist.

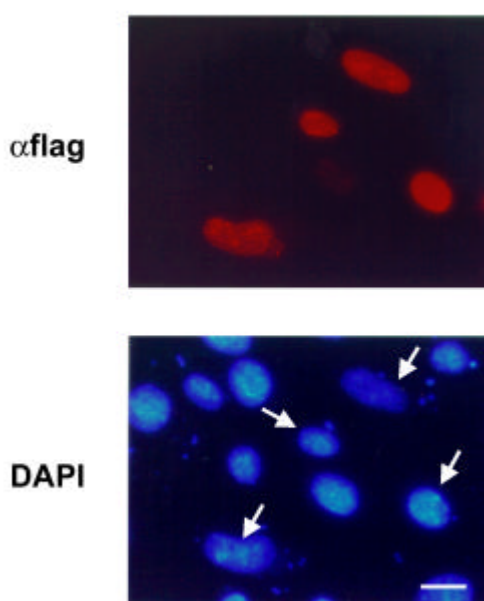


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung von I24 Zellen zur Untersuchung der Lokalisation von IIP-10. Eine IIP-10-Expression kann im Kern dieser Zellen detektiert werden. Mit pcDNAflag-IIP-10 transient transfizierte I24 Zellen wurden mittels einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von anti-flag-Antikörpern analysiert. Die Kerne wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt. Die Pfeile markieren transfizierte Zellen. Der Balken entspricht 20 µm.

Mittels einer PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-10 (Abbildung 34) wurde überprüft, ob IIP-10 ein ‘Nukleäres Lokalisationssignal’ aufweist, wodurch seine Lokalisation erklärt werden könnte. Interessanterweise ist tatsächlich N-terminal ein ‘Nukleäres Lokalisationssignal’ vorhanden, welches anscheinend relevant und für das nukleäre ‘Targeting’ von IIP-10 verantwortlich ist.

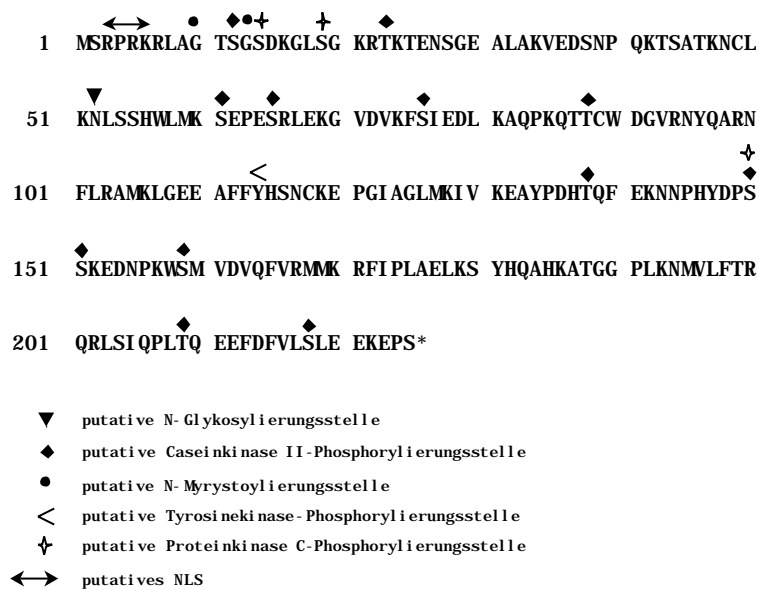


Abbildung 34: PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von IIP-10.

Diskussion

Das IGF-1-Signaltransduktionssystem ist an der Regulation sehr vieler wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt. Die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors führt zu einer vermehrten Proliferation von Zellen und schützt Zellen vor Apoptose (Grothey et al., 1999). Darüber hinaus fungiert IGF-1 als Motilitätsfaktor und ist ein positiver Regulator des invasiven/metastasierenden Phänotyps (Brodt et al., 2000).

Der IGF-1 Rezeptor induziert daher zelluläre Effekte, die sich von denen des sehr verwandten Insulin Rezeptors unterscheiden. Trotzdem sind alle bisher bekannten Signaltransduktionkaskaden und daran beteiligte Signalproteine, die IGF-1-abhängige Effekte vermitteln, auch an der Weiterleitung von Signalen anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen beteiligt. Die Existenz von spezifischeren, bislang unbekannten Signalproteinen für den IGF-1 Rezeptor könnte eine Grundlage der verschiedenen biologischen Aktivitäten des Rezeptors darstellen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, solche IGF-1 Rezeptor-bindende Proteine mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems zu identifizieren und die funktionelle Relevanz dieser Proteine in Bezug auf den IGF-1 Rezeptor aufzuklären.

1. Identifizierung von Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors in ‘2-Hybrid-Screens‘

1.1. Qualitative Aspekte der ‘2-Hybrid-Screens‘

Es wurden aus 2 cDNS-Bibliotheken, einer Maus-Embryo- und einer Jurkat-cDNS-Bibliothek, Interaktionspartner für den IGF-1 Rezeptor mittels des 2-Hybrid-Systems isoliert. Da von der Qualität der cDNS-Bibliotheken das Ergebnis eines ‘2-Hybrid-Screens‘ abhängt, stellt die Auswahl der Bibliotheken einen sehr wichtigen Punkt in dem ‘Screening-Prozeß‘ dar.

2-Hybrid-cDNS-Bibliotheken zeichnen sich unter anderem durch die Anzahl an unabhängigen Klonen, d.h. durch die Vielfalt der in diesen Bibliotheken kodierten cDNSs aus. Durchschnittlich sollte die Anzahl an unabhängigen Klonen bei 1×10^6 liegen, damit jedes in einer Zelle exprimierte Gen in der cDNS-Bibliothek enthalten ist. Ein weiterer Hinweis auf die Qualität einer 2-Hybrid-cDNS-Bibliothek ist, wie oft diese schon für die Suche nach neuen Interaktionspartnern erfolgreich verwendet wurde. In der Tat wurden aus den in dieser Arbeit verwendeten Maus-Embryo- und Jurkat-cDNS-Bibliotheken eine Reihe von interessanten Signalproteinen isoliert (siehe Einleitung).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten in diesen beiden ‘2-Hybrid-cDNS-Bibliotheken‘ mit dem IGF-1 Rezeptor als Köder eine Reihe von neuen vielversprechenden IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteinen (IIPs) isoliert werden.

Bei der Analyse der als Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors isolierten Proteine stellte sich heraus, daß ein sehr hoher Prozentsatz spezifische Bindeproteine sind (Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek: 97,9 %; Jurkat-cDNS-Bibliothek: 86,9 %), während sehr wenige Klone falschpositiv waren. Dies ist als sehr positiv zu bewerten, da oftmals in ‘2-Hybrid-Screens‘ ein wesentlich größerer Anteil an nicht relevanten Interaktionspartnern wie Transkriptionsfaktoren isoliert werden.

Für die Qualität der ‘2-Hybrid-Screens‘ spricht außerdem, daß von vielen Interaktionspartnern überlappende cDNS-Klone isoliert wurden.

1.2. Bekannte Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

Von den spezifischen Interaktionsklonen kodiert der größte Teil, ca. 80 %, für schon bekannte IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine wie die p85 α -, p85 β - und p55- Untereinheiten der PI3-Kinase (Lamothe et al., 1995; Mothe et al., 1997), Grb10 (Morriane et al., 1996), mSH2B (Wang und Riedel, 1998) und 14-3-3 β (Furlanetto et al., 1997). Bis auf 14-3-3 β weisen diese Signalproteine alle eine SH2-Protein-Interaktionsdomäne auf, die die Bindung an Phosphotyrosin-Reste der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors vermittelt. Daß die Bindung an den Rezeptor über die SH2-Domäne erfolgt, spiegeln auch die in den '2-Hybrid-Screens' isolierten partiellen cDNSs dieser Proteine wider. Diese kodieren mindestens für die SH2-Domäne (Abbildung 9). Von 14-3-3 β wurde der gesamte offene Leserahmen isoliert. Im Gegensatz zu den oben erwähnten SH2-Proteinen weisen 14-3-3 Proteine keine definierten Protein-Interaktionsdomänen auf, über die die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor erfolgen könnte. Craparo et al. konnten jedoch für 14-3-3 ϵ zeigen, daß die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor über den N-terminalen Bereich des Proteins (AS 1-203) vermittelt wird (Craparo et al., 1997).

Bemerkenswerterweise wurden nur solche bekannten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors isoliert, die an den C-terminalen Bereich des Rezeptors binden. Die Bindung der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase und von mSH2B wird durch den Phosphotyrosin-Rest an Position 1316, aber auch durch den in der juxtamembranen Region liegenden Phosphotyrosin-Rest an Position 960 vermittelt (Seely et al., 1995) (Wang und Riedel, 1998), während für Grb10 gezeigt wurde, daß der Phosphotyrosin-Rest an Position 960 für die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor nicht relevant ist (Dey et al., 1996). Daher ist davon auszugehen, daß die Grb10-Bindung an C-terminale Phosphotyrosin-Reste des Rezeptors erfolgt. Für 14-3-3 ϵ konnten C-terminale phosphorylierte Serinreste (Position 1272 und 1283) als Bindemotiv definiert werden (Craparo et al., 1997).

Signalproteine, die ausschließlich mit der juxtamembranen Region und dort speziell mit dem NPEY-Motiv an Position 957-960 interagieren, wie die Insulin-Rezeptor-Substrate und SHC (He et al., 1996; He et al., 1995) konnten im Rahmen der '2-Hybrid-Screens' nicht isoliert werden. Dies könnte darin begründet sein, daß die juxtamembrane Domäne des IGF-1 Rezeptors in dem LexA-Fusionsprotein für Bindungspartner aus sterischen Gründen nicht zugänglich ist oder nicht phosphoryliert wird.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein LexA-Fusionsprotein konstruiert, in dem die juxtamembrane Domäne des IGF-1 Rezeptors C-terminal an die sehr potente Kinase-Domäne der onkogenen tpmet-Tyrosinkinase fusioniert wurde. Damit ist die juxtamembrane Region des IGF-1 Rezeptors in diesem LexA-Fusionsprotein am C-Terminus lokalisiert, der aus sterischen Gründen durch die tpmet-Tyrosinkinase leichter phosphorylierbar und für potentielle Interaktionspartner besser zugänglich sein könnte. Tatsächlich konnte unter Verwendung des tpmet-LexA-Konstruktes im 2-Hybrid-System eine Interaktion zwischen der juxtamembranen Domäne des IGF-1 Rezeptors und SHC nachgewiesen werden. Daher ist es vorstellbar, mit diesem LexA-Fusionsprotein in einem '2-Hybrid-Screen' weitere spezifische Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors zu finden, die mit der juxtamembranen Region des Rezeptors interagieren.

Die meisten der isolierten bekannten Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors sind als Interaktionspartner für sehr viele andere Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben worden. In Abbildung 13 ist erkennbar, daß p85 β mit dem Insulin Rezeptor, c-ros, c-met, c-ret, c-kit und mit c-fms

interagiert. Grb10 wurde als Bindungspartner des Insulin Rezeptors, des EGF-, PDGF β - und FGF-Rezeptors sowie des c-met, c-ret und ELK-Rezeptors beschrieben (He et al., 1998; Pandey et al., 1995; Stein et al., 1996; Wang et al., 1999). mSH2B/PSM bindet ebenfalls nicht nur an den IGF-1 Rezeptor, sondern auch an den Insulin Rezeptor und an den PDGF β Rezeptor (Riedel et al., 1997; Riedel et al., 2000). Nur für 14-3-3 β sind bislang unter den Rezeptor-Tyrosinkinasen keine anderen Interaktionspartner als der IGF-1 Rezeptor bekannt. 14-3-3 β interagiert auch nicht mit dem dem IGF-1 Rezeptor sehr verwandten Insulin Rezeptor (Furlanetto et al., 1997). Allerdings bindet 14-3-3 an IRS-1, einem sehr wichtigen Interaktionspartner des Insulin Rezeptors, so daß durch die Bindung von 14-3-3 ϵ an IRS-1 auch die durch Insulin induzierte Signaltransduktion beeinflußt wird (Craparo et al., 1997).

1.3. Neue Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors

Interessanterweise wurden in den '2-Hybrid-Screens' jedoch nicht nur bekannte Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors identifiziert, sondern auch solche Proteine, die bislang noch nicht als Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors bekannt sind. Auch von diesen Proteinen sind die meisten als Bindungspartner für andere Rezeptor-Tyrosinkinasen bekannt. In 2-Hybrid-Experimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß fast alle mit dem Insulin Rezeptor interagieren (Abbildung 12). Das SH2-Protein APS bindet nicht nur an den IGF-1 Rezeptor und den Insulin Rezeptor sondern außerdem an c-kit und den PDGF Rezeptor (Yokouchi et al., 1997; Yokouchi et al., 1999). Auch die src-ähnliche Kinase p59fyn interagiert mit anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen wie mit c-fms, TrkB und mit den Eph-Rezeptoren EphA8 und HEK2 (Choi und Park, 1999; Hock et al., 1998; Iwasaki et al., 1998; Marks et al., 1999). Das Adaptorprotein Grb7, das starke Homologien zu Grb10 aufweist, zeigt ebenfalls Interaktion mit vielen anderen Rezeptoren. Zu diesen gehören verschiedene ErbB-Rezeptoren, der EGF Rezeptor, die Tek-Rezeptor-Tyrosinkinase, c-ret, c-kit und die PDGF α und β Rezeptoren (Fiddes et al., 1998; He et al., 1998; Janes et al., 1997; Jones et al., 1999; Pandey et al., 1996; Thommes et al., 1999; Yokote et al., 1996). Auch das Adaptorprotein nck hat noch andere Bindungspartner unter den Rezeptor-Tyrosinkinasen. Nck bindet z.B. an die EPH-Rezeptoren HEK2 und Elk sowie an den VEGF Rezeptor (Hock et al., 1998; Igarashi et al., 1998; Stein et al., 1998). Diese Übersicht zeigt deutlich, daß all diese SH2-Proteine nicht nur an Signaltransduktionskaskaden des IGF-1 Rezeptors sondern auch an denen anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen beteiligt sind.

Schon bei den isolierten partiellen cDNSs der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase und von Grb10 stellte sich heraus, daß diese jeweils für die SH2-Domäne dieser Proteine kodieren. Das gleiche trifft für APS, p59fyn und nck zu. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, daß die Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor über die SH2-Domäne vermittelt wird, wobei die Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste des Rezeptors stattfindet und somit von einer intakten Tyrosin-Kinase abhängig ist. Diese Phosphotyrosin-abhängige Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor konnte in '2-Hybrid-Experimenten' unter Verwendung der Kinase-inaktiven Mutante des Rezeptors verifiziert werden. Diese Mutante zeigt keine Interaktion mit den SH2-Domänen p85, Grb10, APS, p59fyn und nck (Abbildung 8).

Bemerkenswerterweise wurden nicht nur Proteine mit einer SH2-Domäne als neue Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors identifiziert, sondern auch solche Proteine, die sich nicht durch eine der

bekannten Phosphotyrosin-Bindedomänen (SH2, PTB) auszeichnen wie Zfp38, Pax3, IIP-1 und IIP-10.

Das Zinkfingerprotein Zfp38 weist sieben Cys₂His₂-Zink-komplexierende Finger auf und spielt als Transkriptionsfaktor in der Spermatogenese eine Rolle (Noce et al., 1992). Zinkfinger-Motive sind vor allem als DNS-Bindungsdomänen beschrieben worden, vermitteln jedoch auch Protein-Protein-Interaktionen (Mackay und Crossley, 1998). Interessanterweise sind auch schon andere Zinkfingerproteine bekannt, die mit einer Rezeptor-Tyrosinkinase interagieren. So bindet beispielsweise ZPR1 über seine Zinkfinger-Domäne an den EGF-Rezeptor (Galcheva-Gargova et al., 1996). Das Homeobox-Protein Pax3 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der vor allem während der Embryogenese eine Rolle spielt (Goulding et al., 1991). Transkriptionsfaktoren treten im Rahmen von '2-Hybrid-Screens' oftmals als Falschpositive auf, da diese über eigene DNS-Bindungs- und Transaktivierungsdomänen verfügen, die die Transkription der Reportergene unabhängig von einer Interaktion zwischen Köder- und Fisch-Protein (siehe Einleitung) aktivieren können. Daher könnte man annehmen, daß es sich bei Zfp38 und Pax3 um Falschpositive handelt. Dem widerspricht jedoch der Befund, daß sie weder mit der Negativkontrolle Lamin (Daten nicht gezeigt) noch mit der Kinase-inaktiven Mutante des IGF-1 Rezeptors interagieren (Abbildung 11). In weiteren Untersuchungen konnte eine Bindung an den Insulin Rezeptor (Abbildung 12) und an andere Rezeptor-Tyrosinkinasen (Daten nicht gezeigt) festgestellt werden. Daraus wird ersichtlich, daß Zfp38 und Pax3 zwar keine falschpositiven Klone darstellen, jedoch im Vergleich zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen keine Bindungsspezifität für den IGF-1 Rezeptor aufweisen.

Zusätzlich zu den Interaktionspartnern, die an verschiedene andere Rezeptor-Tyrosinkinasen binden wie APS, Grb7, nack und Zfp38 und Pax3 wurden auch zwei Proteine identifiziert, die an den IGF-1 Rezeptor jedoch nicht an den Insulin Rezeptor binden: IIP-1 und IIP-10 (für IGF-1 Rezeptor-interagierende Proteine-1 und -10). Vor allem IIP-1 hebt sich von den anderen identifizierten Proteinen dadurch ab, daß es nicht nur keine Interaktion mit dem Insulin Rezeptor zeigt, sondern auch nicht mit einer Reihe anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen wie c-met, c-ros, c-ret, c-kit und c-fms interagiert (Abbildung 13). Außerdem zeigt IIP-1 – im Gegensatz zu allen anderen isolierten Interaktionspartnern – eine Kinase-unabhängige Bindung an den IGF-1 Rezeptor. Aufgrund dieser 2-Hybrid-Daten, die eine Funktion von IIP-1 als spezifisches Bindeprotein für den IGF-1 Rezeptor implizieren, wurde die Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor und ihre funktionelle Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert.

IIP-10 scheint ebenfalls ein vielversprechender Kandidat als spezifischer Interaktionspartner für den IGF-1 Rezeptor zu sein, da es wie IIP-1 nicht an den Insulin Rezeptor bindet. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen scheint jedoch sehr transient zu sein, da mittels Immunfluoreszenzstudien eine nukleäre Lokalisation von IIP-10 festgestellt wurde (Abbildung 33). Es wäre ein ähnlicher Mechanismus wie bei den STAT-Signaltransduktoren denkbar, deren Assoziation mit aktivierten Zytokin-Rezeptoren auch nur sehr transient ist und über die mit dem Rezeptor assoziierten JAK-Kinasen vermittelt wird (Ihle, 2001). Nach Phosphorylierung der STAT-Proteine löst sich der Komplex, die phosphorylierten STAT-Proteine bilden Dimere, wandern in den Kern und aktivieren dort die Transkription bestimmter Effektorgene. Vorläufige Daten weisen durchaus auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen IIP-10 und IGF-1 Rezeptor hin. IIP-10 scheint nämlich sowohl IGF-1-stimulierte Proliferation als auch IGF-1-vermittelten Apoptoseschutz zu inhibieren und somit mit IGF-1-regulierten Signaltransduktionskaskaden zu interferieren (Weidner et al., 2000). Es

sind jedoch weitere experimentelle Studien notwendig, um diesen Zusammenhang, vor allem vor dem Hintergrund der nukleären Lokalisation von IIP-10 und der schwachen Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor, zu untermauern.

2. IIP-1 als spezifischer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors im 2-Hybrid-System

Bei der näheren Analyse der Bindungsspezifität der in den '2-Hybrid-Screens' isolierten Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors stellte sich heraus, daß IIP-1 nicht mit dem Insulin Rezeptor und mit anderen getesteten Rezeptor-Tyrosinkinasen interagierte (s.o.). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein besonderer Focus auf die Charakterisierung von IIP-1 als spezifischer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors gelegt.

2.1. Die Bedeutung der PDZ-Domäne als Bindedomäne für den IGF-1 Rezeptor

Interessanterweise besitzt IIP-1 eine zentrale PDZ-Domäne, die die Bindung an den IGF-1 Rezeptor vermittelt (Abbildung 19). 2-Hybrid-Analysen von Deletionsmutanten der PDZ-Domäne zeigten, daß eine Bindung an den IGF-1 Rezeptor nicht mehr möglich ist, wenn N- oder C-terminale Bereiche der PDZ-Domäne deletiert sind, während eine intakte PDZ-Domäne alleine durchaus noch eine Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor vermitteln kann.

Die PDZ-Domäne ist eine bekannte Protein-Interaktionsdomäne, die in vielen Proteinen gefunden wurde, die mit der Zellmembran assoziiert sind. Dort sind sie u.a. an der Bildung von Zell-Zellkontakten, an einem 'Clustering' von Membrankanälen und an intrazellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt (Fanning und Anderson, 1999). Die Besonderheit vieler PDZ-Proteine ist, daß sie oftmals als 'Docking-Proteine' für mehrere Bindungspartner fungieren (Fanning und Anderson, 1999). Parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden auch für die PDZ-Domäne von IIP-1 eine Reihe von anderen Bindungspartnern beschrieben: IIP-1 wurde beispielsweise als GIPC ('**GAIP** interacting **p**rotein, **C**-terminus') identifiziert, das mit GAIP ('**G**_α interacting **p**rotein') interagiert (De Vries et al., 1998). GAIP ist ein membranassoziiertes RGS-Protein ('**R**egulator of **G**-protein signaling') und hat eine Funktion als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) der G_{αi3}-Untereinheit (De Vries et al., 1996). Außerdem wurde IIP-1 als Semcap-1 ('**Sem**-F cytoplasmatic domain-associated **p**rotein-1') beschrieben. Semcap-1 bindet an das Transmembran-Semaphorin M-SemF, dessen Funktion bislang ungeklärt ist. Auch ein anderer Interaktionspartner für IIP-1, Neuropilin-1 (Cai und Reed, 1999), ist an dem Signaltransduktionssystem der Semaphorine beteiligt. Neuropilin-1 fungiert als Rezeptor für Semaphorin III/Collapsin-1, das eine inhibitorische Rolle bei der Ausbildung von Axonen spielt (Tamagnone und Comoglio, 2000). IIP-1 zeigt jedoch nicht nur Bindung an die gerade beschriebenen Proteine, sondern ist auch stark homolog zu Synectin, das mit Syndecan-4 interagiert (Gao et al., 2000). Syndecane sind Transmembran-Heparansulfat-Proteoglycane, die Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln und somit an der Regulation von Adhäsions- und Migrationsprozessen beteiligt sind (Rapraeger, 2000). Damit könnte IIP-1 ebenfalls eine 'Docking-Funktion' zukommen, indem es den IGF-1 Rezeptor in andere zytoplasmatische Signalkomplexe integriert (s. u.).

Viele zytoplasmatische Proteine, die mit PDZ-Proteinen interagieren, sind Komponenten diverser Signaltransduktionskaskaden. Dazu zählen Ionenkanäle, regulatorische Proteine für G-Proteine, Proteinkinasen, Phospholipase C oder GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) für GTP-bindende Proteine wie Rac und Rho (Fanning und Anderson, 1999). Rezeptor-Tyrosinkinasen waren jedoch bislang als Interaktionspartner für PDZ-Domänen kaum bekannt. Erst in jüngster Zeit wurden eine Reihe von Interaktionen zwischen Rezeptor-Tyrosinkinasen und PDZ-Proteinen beschrieben. Einige dieser PDZ-Proteine vermitteln z.B. die korrekte Membran-Lokalisation von Mitgliedern der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie. PSD-95 interagiert mit ErbB4 an neuronalen Synapsen (Garcia et al., 2000) und Erbin spielt eine Rolle bei der Lokalisation von ErbB2 an basolateralen Membranstrukturen von Epithelzellen (Borg et al., 2000). Sogar in *C.elegans* wurde eine Interaktion zwischen dem EGF Rezeptor-Homolog let-23 und den PDZ-Proteinen lin-2, lin-7 und lin-10 an basolateralen Membranregionen von Vulva-Epithelzellen beschrieben (Kaeck et al., 1998). Die Konservierung von PDZ-Rezeptor-Tyrosinkinase-Interaktionen in der Evolution unterstützt die Bedeutung dieser Art von Wechselwirkung in der Regulation zellulärer Funktionen. In *C. elegans* gibt es auch 2 homologe Proteine zu IIP-1, F44D12.4 und C35D10.2, deren Funktion jedoch noch nicht geklärt ist.

In letzter Zeit wurden noch weitere Interaktionen zwischen PDZ-Proteinen und Rezeptor-Tyrosinkinasen gefunden. So interagieren verschiedene EPH Rezeptoren mit dem ras-Bindeprotein AF-6 (Buchert et al., 1999; Hock et al., 1998), der PDGF Rezeptor assoziiert mit NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor), was in einer erhöhten Rezeptoraktivität resultiert (Maudsley et al., 2000) und c-kit bindet an MUPP-1 (multiple PDZ domain containing protein-1), ein aus 13 PDZ Domänen bestehendes Protein (Mancini et al., 2000). Daraus wird deutlich, daß nicht nur SH2- und PTB-Domänen als Protein-Interaktionsdomänen für Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Rolle spielen, sondern sich zunehmend herausstellt, daß auch PDZ-Proteine als Interaktionspartner für Rezeptor-Tyrosinkinasen funktionell bedeutsam sind.

2.2. Die Bedeutung des C-Terminus des IGF-1 Rezeptors als Bindungsstelle für IIP-1

Da die meisten PDZ-Proteine an den äußersten C-Terminus ihrer Interaktionspartner binden (Fanning und Anderson, 1999), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch der C-Terminus des IGF-1 Rezeptors die Interaktion mit IIP-1 vermittelt. Mit C-terminalen Peptiden des IGF-1 Rezeptors konnte gezeigt werden, daß tatsächlich die C-terminalen 11 Aminosäuren des Rezeptors für die Bindung von IIP-1 verantwortlich sind, wobei die letzten drei Aminosäuren eine besonders wichtige Rolle für diese Interaktion spielen (Abbildung 20). Der Austausch einer dieser Aminosäuren gegen die korrespondierende Aminosäure des Insulin Rezeptors hat den völligen Verlust der Interaktion zur Folge. Damit ist die Interaktion zwischen IIP-1 und dem C-Terminus des IGF-1 Rezeptors eine klassische PDZ-Interaktion. Es gibt nur wenige Beispiele für PDZ-Proteine, die an interne Bereiche von Proteinen binden. Die meisten PDZ-Proteine binden an den C-Terminus ihrer Interaktionspartner (Fanning und Anderson, 1999), wobei die letzten drei Aminosäuren entscheidend für die Interaktion sind. Zwei verschiedene C-terminale Konsensus-Bindungsmotive wurden beschrieben. Typ I PDZ-Proteine binden an den Konsensus Ser/Thr-X-Val (oder eine andere hydrophobe Aminosäure an letzter Position). Typ II PDZ-Proteine erkennen dagegen den Konsensus Phe/Tyr-X-Ala/Phe/Val (Ponting et al., 1997; Songyang et al., 1997). Interessanterweise interagiert IIP-1 sowohl mit Typ I- als auch mit Typ II-Motiven: die Bindungsstellen im IGF-1 Rezeptor (Ser-Thr-Cys), in GAIP (Ser-Glu-Ala), in Neuropilin-1 (Ser-Glu-Ala) und in M-SemF (Ser-Ser-Val) entsprechen einem Typ I-Bindemotiv,

während der C-Terminus von Syndecan-4 ein Typ II-Motiv (Phe-Tyr-Ala) darstellt. Die Rezeptor-Tyrosinkinasen, die nicht mit IIP-1 interagieren (Abbildung 13), aber auch viele andere Rezeptor-Tyrosinkinasen, die nicht auf Interaktion mit IIP-1 getestet wurden, besitzen interessanterweise keinen C-Terminus, der zu einem dieser Bindemotive homolog wäre. Nur eine Rezeptor-Tyrosinkinase, SKY/Tyro-3, konnte bislang in den öffentlichen Datenbanken identifiziert werden, die einen dem IGF-1 Rezeptor sehr ähnlichen C-Terminus (Ser-Ser-Cys) aufweist (Ohashi et al., 1994). Zur Zeit wird untersucht, ob diese Rezeptor-Tyrosinkinase in der Lage ist, an IIP-1 zu binden. Der *C.elegans* IGF-1/Insulin Rezeptor daf-2 (Kimura et al., 1997) weist zwar mit den C-terminalen Aminosäuren Pro-Leu-Val kein PDZ-Bindungsmotiv auf, aber auch in diesem Falle wäre es interessant, die Interaktion mit den *C. elegans* Proteinen, die Homologie zu IIP-1 aufweisen, F44D12.4 und C35D10.2, zu überprüfen.

IIP-1 scheint jedoch nicht nur mit dem C-Terminus von Proteinen zu interagieren. Kürzlich wurde die Interaktion von IIP-1/GIPC mit dem NGF Rezeptor TrkA beschrieben (Lou et al., 2001), wobei der juxtamembrane Anteil des Rezeptors (Aminosäuren 472-493) die Bindung an IIP-1/GIPC vermittelt, und nicht - wie im Falle des IGF-1 Rezeptors - die C-terminale Region für die Interaktion mit IIP-1 verantwortlich ist. Lou et al. zeigten darüber hinaus, daß IIP-1/GIPC TrkA in einen Signaltransduktionskomplex mit GAIP (siehe 2.1.) integriert, wodurch eine Verbindung von NGF-induzierten Signaltransduktionskaskaden und G-Protein-regulierten Signalwegen ermöglicht wird (Lou et al., 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für eine Kopplung des IGF-1 Rezeptors an G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskaden durch IIP-1 denkbar (s. u.).

3. IIP-1 als spezifischer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors in Säugetierzellen

3.1. Interaktion zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in Säugetierzellen

Daß die Interaktion zwischen IIP-1 und dem IGF-1 Rezeptor in einem zellulären Kontext relevant ist, wurde in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten aus Säugetierzellen (Abbildung 22) gezeigt. Auch in diesem zellulären System ist eine Kinase-unabhängige Bindung von IIP-1 an den IGF-1 Rezeptor zu beobachten. Außerdem konnten die Ko-Immunpräzipitationsexperimente die im 2-Hybrid-System beobachtete Spezifität von IIP-1 für den IGF-1 Rezeptor im Vergleich zum Insulin Rezeptor bestätigen. Ein weiterer Hinweis darauf, daß die Interaktion von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor durchaus auch in Säugetierzellen eine Bedeutung hat, sind die Immunfluoreszenz-Studien (Abbildung 28). Mittels dieser Antikörper-Färbungen konnte in MCF-7 Zellen eine Ko-Lokalisation von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in Membran-nahen Bereichen des Zytoplasmas nachgewiesen werden.

Betrachtet man all diese Daten zusammen, wird deutlich, daß IIP-1 tatsächlich ein auch in Säugetierzellen relevanter, spezifischer Bindungspartner des IGF-1 Rezeptor ist. Damit könnte IIP-1 an der Vermittlung IGF-1-abhängiger zellulärer Effekte wie Proliferation, Apoptoseschutz und Motilität beteiligt sein, die sich deutlich von den durch Insulin induzierten metabolischen Effekten unterscheiden.

3.2. Ko-Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor

In Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß IIP-1 in normalen adulten und embryonalen Geweben ubiquitär exprimiert wird (Abbildung 23, Abbildung 24). Auch der IGF-1 Rezeptor wurde als ubiquitär exprimiert beschrieben (Rubin und Baserga, 1995). Zudem konnte in Immunoblot-Experimenten demonstriert werden, daß die Expressionsstärke von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in verschiedenen Tumorzellen und Normalzellen korreliert (Abbildung 26). Dabei ist auffallend, daß Zellen epithelialer Herkunft, unabhängig davon, ob es normale oder entartete Zellen sind, eine wesentlich stärkere Expression sowohl des IGF-1 Rezeptors als auch von IIP-1 aufweisen als nicht-epitheliale Zellen. Dieses ähnliche Expressionsmuster von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor weist deutlich darauf hin, daß die Expression der beiden Proteine ko-reguliert ist. Es wäre sowohl eine Regulation der Ko-Expression auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene denkbar. Neben den Ko-Lokalisationsdaten sind diese Ko-Expressionsdaten ein weiterer Hinweis darauf, daß die Interaktion zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor funktionell relevant ist.

3.3. Einfluß von IIP-1 auf IGF-1-regulierte Zellfunktionen

Der IGF-1 Rezeptor spielt bei der Entstehung und Progression sehr vieler verschiedener Tumore eine Rolle (Macaulay, 1992) und eine Überexpression von IGF-1/IGF-1 Rezeptor konnte in vielen Tumorzelllinien festgestellt werden (Quinn et al., 1996). Auch funktionell konnte das IGF-1 Rezeptor-Signaltransduktionssystem mit Prozessen der Tumorigenese korreliert werden. Beispielsweise werden dem IGF-1 Rezeptor mitogene, anti-apoptotische und transformierende Eigenschaften zugeschrieben (Kaleko et al., 1990; Resnicoff et al., 1995; Yoshinouchi und Baserga, 1993) und sein Ligand IGF-1 fungiert als Motilitätsfaktor für Tumorzellen (Klemke et al., 1994; Stracke et al., 1989).

Die funktionelle Bedeutung von IIP-1 in Bezug auf tumorigene Eigenschaften des IGF-1 Rezeptors wie Proliferation, Apoptoseschutz und Migration wurde in der Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht. Es gibt experimentelle Hinweise, daß der IGF-1 Rezeptor an der Entwicklung von Brustkrebs beteiligt ist und in Krebszellen im Vergleich zu normalem Brustepithel oder gutartigen Tumoren überexprimiert wird (Dickson und Lippman, 1995; Lee und Yee, 1995). Zudem ist das MCF-7-Zellsystem ein etabliertes System zur Untersuchung IGF-1-abhängiger Effekte wie Proliferation (Arteaga et al., 1989), Apoptoseschutz (Ahmad et al., 1999) und Migration (Doerr und Jones, 1996).

Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ‘Proliferationsassays’ zeigte sich ein stimulatorischer Einfluß von IGF-1 auf die Proliferation von MCF-7 Zellen. Durch Zugabe von IGF-1 konnte die Proliferation dieser Zellen um etwa 50-60 % im Vergleich zu ruhenden Zellen gesteigert werden (Abbildung 30). Jedoch scheint IIP-1 diese IGF-1-abhängige Proliferation nicht zu beeinflussen. Wurde nämlich die IIP-1 Expression in stabilen IIP-1-Transfektanten durch das Tetracyclin-Derivat Doxycyclin induziert, konnte kein verändertes IGF-1-abhängiges Proliferationsverhalten der Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Resultaten von Gao et al., die Synectin, das eine sehr hohe Sequenzhomologie zu IIP-1 zeigt, als Interaktionspartner für Syndecan-4 isoliert haben (Gao et al., 2000). Gao et al. konnten in der endothelialen Zelllinie ECV304 ebenfalls keinen Einfluß von Synectin auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen beobachten.

Außerdem konnte in ‘Apoptoseassays’ gezeigt werden, daß IIP-1 keinen Einfluß auf einen durch IGF-1 induzierten Apoptoseschutz von MCF-7 Zellen hat.

Interessanterweise fiel IIP-1 jedoch als negativer Effektor der Migration von MCF-7 Zellen auf. IIP-1-Transfektanten, die IIP-1 nach Zugabe von Doxycyclin überexprimierten, zeigten eine deutlich verringerte gerichtete Motilität von serumfreiem zu serumhaltigem Medium (20 % FKS) hin im Vergleich zu den Transfektanten, in denen IIP-1 in Abwesenheit von Doxycyclin nicht überexprimiert wurde. Dieses Ergebnis demonstriert eindeutig, daß IIP-1 die Migration von MCF-7 Zellen inhibiert. Da IGF-1 in physiologischen Konzentrationen in FKS enthalten ist und außerdem als Motilitätsfaktor für MCF-7-Zellen beschrieben wurde (Doerr und Jones, 1996), könnte die motilitätsinhibierende Wirkung einer IIP-1-Überexpression auf eine Interferenz mit durch den IGF-1 Rezeptor regulierten Signaltransduktionskaskaden zurückgehen.

Ergänzend zu diesen funktionellen 'Assays' wurde auf molekularer Ebene die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1 und ERK-2 durch IGF-1 in IIP-1-Transfektanten analysiert. Dabei zeigte sich, daß eine IIP-1-Überexpression zu einer verminderten Aktivierung dieser Kinasen durch IGF-1 führt (Abbildung 32), während die Aktivierung der Akt-Kinase unbeeinflusst bleibt (Daten nicht gezeigt). Da der PI3-Kinase/Akt-Kinase-Signaltransduktionsweg sehr stark an der Vermittlung IGF-1-induzierter Proliferations- und Apoptoseschutz-Signalen beteiligt ist (Butler et al., 1998), könnten mit diesem Befund die Ergebnisse der 'Proliferations- und Apoptoseassays' erklärt werden, in denen kein Effekt von IIP-1 auf diese IGF-1-vermittelten Zellfunktionen festgestellt werden konnte. Hingegen spielt die MAP-Kinase eine essentielle Rolle bei der Regulation von Migrationsprozessen durch Wachstumsfaktoren und Integrine (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Interessanterweise bleibt auch bei einer NGF-induzierten Aktivierung der TrkA Rezeptor-Tyrosinkinase, die ebenfalls als Bindungspartner für IIP-1/GIPC beschrieben wurde, durch eine IIP-1/GIPC-Überexpression die Aktivierung der Akt-Kinase unbeeinflusst, während die MAP-Kinase-Aktivierung auch hier deutlich reduziert ist (Lou et al., 2001). IIP-1/GIPC wurde u.a. als Bindungspartner für GAIP ('G_α interacting protein') identifiziert (De Vries et al., 1998). GAIP ist ein RGS-Protein ('regulator of G-protein signaling') und hat eine Funktion als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für G_{ki}-Untereinheiten. Damit spielt es eine Rolle in G-Protein-vermittelter Signaltransduktion. Interessanterweise gibt es neue Erkenntnisse, daß auch der IGF-1 Rezeptor über die G_{ki}-Untereinheit an G-Protein-vermittelte Signalwege gekoppelt ist, was letztendlich in einer Aktivierung der MAP-Kinase resultiert (Dalle et al., 2001). Es wäre vorstellbar, daß IIP-1 über eine Interaktion mit GAIP den IGF-1 Rezeptor mit diesem Signalweg verbindet (s.u.).

3.4. Entwicklung eines Modells für die Funktion von IIP-1 in Bezug auf Migrationsprozesse von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß IIP-1 ein für den IGF-1 Rezeptor spezifischer Interaktionspartner ist, der IGF-1-regulierte Zellfunktionen beeinflusst. So hat eine IIP-1-Überexpression einen inhibierenden Einfluß auf eine durch IGF-1-induzierte MAP-Kinase-Aktivierung und interferiert mit der Migration von MCF-7-Zellen, einem u.a. durch IGF-1 regulierten Prozeß.

Migration von Zellen ist ein komplexer, streng regulierter und dynamischer Prozeß, der von einer Reihe verschiedenster Signalkomponenten beeinflusst wird. Vor allem Integrine spielen in diesem Prozeß eine entscheidende Rolle. Durch die Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen kommt es zu einer Komplexierung von Integrinen an der Zellmembran und im folgenden zu einer Assoziation mit Proteinen des Zytoskelettes und mit weiteren Signalkomplexen. Dies wiederum führt zu einer

Phosphorylierung der FAK-Kinase ('focal adhesion kinase') und letztendlich durch eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges zu einer *de novo* Transkription von Integrinen, Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), EZM-degradierenden Enzymen und Matrix-Metalloproteinasen (Boudreau und Jones, 1999). Neben diesen transkriptionsabhängigen Prozessen werden durch den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg zusätzlich zelluläre Prozesse reguliert, die nicht von einer *de novo* Transkription abhängig sind. Dazu gehört die Phosphorylierung der MLCK-Kinase (myosin-light-chain kinase) (Klemke et al., 1997). Die Phosphorylierung der Myosin-leichten Kette ist ein kritischer Schritt während der Polymerisation von Aktin-Ketten, was im folgenden zu einer Zellbewegung führt.

Jedoch sind nicht nur Integrine an der Regulation von Migrationsprozessen beteiligt, sondern auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie beispielsweise der IGF-1 Rezeptor. Auf der Ebene der MAP-Kinase-Aktivierung werden die Signale, die durch Integrine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren induziert werden, gebündelt.

Welchen Einfluß könnte nun IIP-1 auf diese zellulären Prozesse, die letztendlich zu einer Migration von Zellen führen, haben?

Es sind drei Modelle denkbar, wie IIP-1 die Aktivierung der MAP-Kinase und somit Motilitätsprozesse von Zellen beeinflussen könnte.

(1) IIP-1 hat einen inhibitorischen Einfluß auf die Aktivierung der MAP-Kinase entweder durch eine Funktion als Effektormolekül oder durch die Interferenz mit anderen Signalproteinen des Rezeptors (Abbildung 35)

(a) IIP-1 könnte über einen direkten Mechanismus, der in seinen Einzelheiten noch aufgeklärt werden müßte, als Effektormolekül des IGF-1 Rezeptors fungieren. Es wäre vorstellbar, daß IIP-1 über die Bindung an den IGF-1 Rezeptor eine inhibitorisch wirkende Signaltransduktionskaskade aktiviert, die letztendlich eine Hemmung der MAP-Kinase zur Folge hätte.

(b) Ein weiterer denkbarer Mechanismus wäre, daß IIP-1 die Bindungsstellen anderer Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors sterisch blockiert. Dadurch könnte IIP-1 die Bindung dieser Effektormoleküle verhindern, so daß diese im folgenden nicht mehr ihre Funktion als Signaltransduktoren des IGF-1 Rezeptors ausüben könnten. Da einige dieser Signalproteine durch Bindung an den Rezeptor an der IGF-1-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinase beteiligt sind, wäre es vorstellbar, daß eine Blockierung dieser Bindungsstellen durch IIP-1 mit der Aktivierung der MAP-Kinase interferiert. Als C-terminaler Bindungspartner des IGF-1 Rezeptors, dessen Interaktion mit dem Rezeptor durch IIP-1 verhindert werden könnte, käme beispielsweise die p85-Untereinheit der PI3-Kinase in Frage. Die PI3-Kinase ist zwar noch an anderen Signaltransduktionskaskaden beteiligt, jedoch wurde sie auch als Aktivator des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges beschrieben (Miura und MacGlashan, 2000).

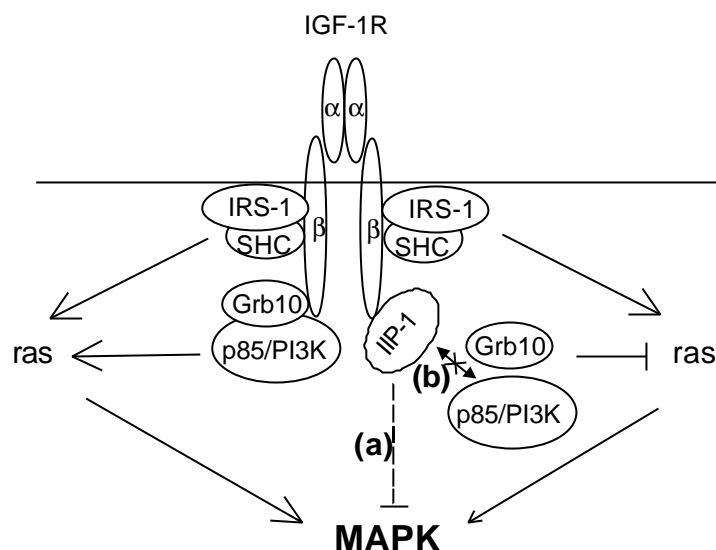


Abbildung 35: Modell zur Funktion von IIP-1 als direkter Inhibitor der MAP-Kinase bzw. als Kompetitor anderer Signalproteine des IGF-1 Rezeptors. Im linken Teil ist die Signaltransduktionskaskade des IGF-1 Rezeptors in der Abwesenheit von IIP-1 dargestellt; im rechten Teil sind hypothetische Modelle, mit denen eine Inhibition dieser Signaltransduktionswege durch IIP-1 erklärt werden könnte, gezeigt. IIP-1 könnte über einen noch nicht geklärten Mechanismus ein negativer Regulator der MAP-Kinase sein und damit eine Hemmung von Migrationsprozessen induzieren (a). IIP-1 könnte jedoch auch über eine Interaktion mit dem C-Terminus des IGF-1 Rezeptors die Bindung anderer Signalproteine des Rezeptors verhindern, was ebenfalls eine Hemmung der MAP-Kinase zur Folge hätte (b). \perp stellt die Inhibition, \downarrow die Aktivierung eines Signalweges dar. Die Größe der Pfeilspitze soll den Aktivierungsgrad des Signalweges anzeigen. EZM, extrazelluläre Matrix; MMP, Matrix-Metalloproteinase.

(2) IIP-1 beeinflusst über G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege die Aktivierung der MAP-Kinase (Abbildung 36)

Dalle et al. konnten zeigen, daß für eine IGF-1-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase die Interaktion mit einer $G_{\alpha i}$ -Untereinheit von trimeren G-Proteinen Voraussetzung ist (Dalle et al., 2001). Es wäre denkbar, daß diese Interaktion zwischen $G_{\alpha i}$ und IGF-1 Rezeptor über IIP-1 und GAIP, ein RGS-Protein, das einerseits als Bindungspartner für $G_{\alpha i}$ beschrieben wurde und andererseits mit IIP-1 interagiert, vermittelt wird. Damit würde IIP-1 als 'Brückenprotein' fungieren, daß den IGF-1 Rezeptor an G-Protein-vermittelte Signalwege koppelt und wäre somit kein Inhibitor einer MAP-Kinase-Aktivierung, sondern essentiell für eine Stimulierung dieser Kinase.

Die bei einer Überexpression von IIP-1 beobachtete Inhibition der MAP-Kinase und die daraus resultierende Hemmung der Motilität von Zellen könnte darauf zurückgeführt werden, daß in diesem Überexpressionssystem die molaren Verhältnisse der einzelnen Komponenten des Signalkomplexes nicht mehr ausgeglichen sind und ein Überschuß an IIP-1 die an dem Komplex beteiligten Proteine (GAIP, IGF-1 Rezeptor) absättigt. Dadurch könnte sich der funktionelle Komplex aus $G_{\alpha i}$, GAIP, IIP-1 und IGF-1 Rezeptor nicht mehr bilden, und es käme zu einer Inhibition der MAP-Kinase und im folgenden u.a. zu einer Interferenz mit Motilitätsprozessen.

Dieses Modell steht in Einklang mit der beobachteten Ko-Regulation der Expression von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor. Nur wenn diese Proteine in dem richtigen molaren Verhältnis zueinander vorliegen,

kommt es zu einer Aktivierung der MAP-Kinase auf physiologischem Niveau. Eine Inhibition der Expression von IIP-1 z.B. über Antisense-Experimente könnte diese Hypothese belegen. Die Abnahme der Konzentration an IIP-1 müßte ebenfalls in einer Auflösung der $G_{\alpha i}$ -IGF-1 Rezeptor-Komplexe und damit in einer Inhibierung der MAP-Kinase resultieren.

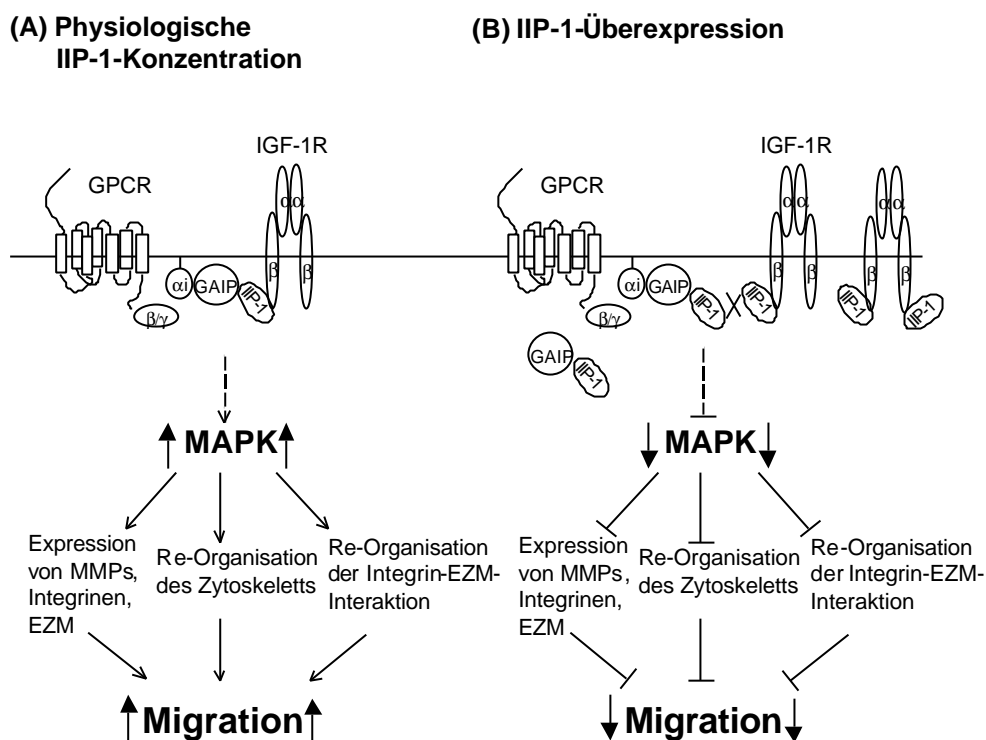


Abbildung 36: Modell zur Funktion von IIP-1 als 'Brückenprotein' in Signalkomplexen aus $G_{\alpha i}$ und IGF-1 Rezeptor. (A) Physiologische Konzentrationen von IIP-1: IIP-1 koppelt den IGF-1 Rezeptor über GAIP an $G_{\alpha i}$. Die Bildung dieser Signalkomplexe ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der MAP-Kinase, die u.a. zelluläre Prozesse wie z.B. die Migration reguliert. (B) Supraphysiologische Konzentrationen von IIP-1 durch Überexpression: IIP-1 sättigt die einzelnen Komponenten des G-Protein/IGF-1 Rezeptor-Komplexes ab, der Signalkomplex kann sich nicht mehr bilden, die MAP-Kinase und durch sie regulierte Prozesse werden gehemmt. \perp stellt die Inhibition, \downarrow die Aktivierung eines Signalweges dar. EZM, extrazelluläre Matrix; MMP, Matrix-Metalloproteinase; GPCR, 'G-protein coupled receptor'.

(3) IIP-1 koppelt den IGF-1 Rezeptor über die Interaktion mit weiteren Bindungspartnern an alternative Signaltransduktionskaskaden (Abbildung 37)

IIP-1 wurde ebenso als Interaktionspartner für Syndecan-4 beschrieben (Gao et al., 2000), einem Transmembran-Proteoglycan, dem eine Funktion in FGF-induzierter Migration zugeschrieben wird (Volk et al., 1999). Daher wäre es auch vorstellbar, daß der IGF-1 Rezeptor über IIP-1 an Syndecan-regulierte Signaltransduktionswege gekoppelt ist und durch diesen Mechanismus eine Inhibition der Migration ausgelöst wird. Interessanterweise fanden Gao et.al. für IIP-1 auch einen hemmenden Effekt auf die Migration der endothelialen Zelllinie ECV304.

Außerdem wurde IIP-1 als Semcap-1 beschrieben (Wang et al., 1999). Semcap-1 bindet an das Transmembran-Semaphorin M-SemF, dessen Funktion bislang ungeklärt ist. Semaphorine haben sehr divergente Funktionen. Sie spielen z.B. eine Rolle während der Entwicklung von Nervengewebe, in der Regulation der Angiogenese sowie in Tumorwachstum und Metastasierung (Comoglio et al., 1999), also vornehmlich in Vorgängen, die mit der Bewegung von Zellen zusammenhängen.

Auch ein anderer Interaktionspartner für IIP-1, Neuropilin-1 (Cai und Reed, 1999), ist an dem Signaltransduktionssystem der Semaphorine beteiligt. Neuropilin-1 fungiert als Rezeptor für Semaphorin III/Collapsin-1, das eine inhibitorische Rolle bei der Ausbildung von Axonen spielt (Tamagnone und Comoglio, 2000). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß sowohl Semaphorine (Yu und Kolodkin, 1999) als auch der IGF-1 Rezeptor (Baserga et al., 1997) bei der Entwicklung von Nervengewebe eine Rolle spielen. IIP-1 könnte über eine Interaktion mit M-SemF und Neuropilin-1 den IGF-1 Rezeptor an Semaphorin-regulierte Signaltransduktionskaskaden im Gehirn koppeln und somit beide Kaskaden in einen Signalweg zusammenführen, der das Auswachsen von Axonen reguliert.

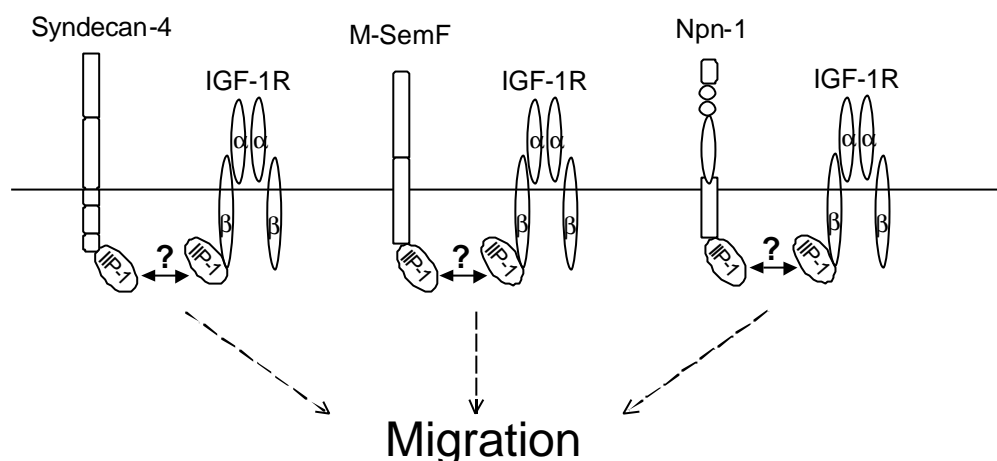


Abbildung 37: Modell zur Darstellung von Syndecan-4, Semcap-1 und Neuropilin-1 als Interaktionspartner von IIP-1. Syndecane und Semaphorine spielen eine Rolle bei der Regulation von Motilitätsprozessen verschiedener Zellen. IIP-1 könnte den IGF-1 Rezeptor als 'Brückenprotein' an Syndecan- und Semaphorin-regulierte Signalwege koppeln, was letztendlich zu einer Inhibition von Migrationsprozessen führen würde. ? weist auf einen möglichen physischen und funktionellen Zusammenhang der Systeme hin.

Zusammenfassend ist aus diesen Befunden zu schließen, daß IIP-1 durch die Interaktion mit anderen zytoplasmatischen Proteinen wie GAIP, Syndecan-4 und Semaphorinen den IGF-1 Rezeptor an die verschiedensten Signaltransduktionskaskaden koppelt, die letztendlich zu einer Regulation von Migrationsprozessen führen. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um den genaueren Zusammenhang zwischen IGF-1 Rezeptor und diesen Signalproteinen experimentell weiter zu belegen.

4. Ausblick

Die Resultate dieser Arbeit werfen eine Reihe von Fragen auf, die in weiterführenden Studien geklärt werden müßten.

Um die genauen Mechanismen, die zu einer durch IIP-1 induzierten Interferenz mit IGF-1 vermittelten Signalwege führen, besser verstehen zu können, müßte in experimentellen Studien der Zusammenhang zwischen den bereits identifizierten Interaktionspartnern von IIP-1 (GAIP, Sem-F, Neuropilin-1 und Syndecan-4) und dem IGF-1 Rezeptor aufgeklärt werden. Außerdem wäre sicherlich von Interesse herauszufinden, ob noch weitere Interaktionspartner für IIP-1 existieren. Diese potentiellen Bindungspartner könnten Aufschluß darüber geben, wie IIP-1 IGF-1 Rezeptor-regulierte Signaltransduktionskaskaden beeinflusst.

Desweiteren bleibt die Frage offen, auf welche Weise ein Protein, das sowohl an den aktivierten als auch an den nicht-aktivierten IGF-1 Rezeptor bindet, die Weiterleitung IGF-1-induzierter Signale in die Zelle vermittelt. Es wäre vorstellbar, daß eine Aktivierung des Rezeptor zu einer Phosphorylierung von IIP-1 an Tyrosin-Resten führt, wodurch wiederum Bindungsstellen für andere Signalproteine entstehen würden. In ersten Studien konnte jedoch IIP-1 nicht als Substrat für die IGF-1 Rezeptor-Kinase identifiziert werden. Da jedoch IIP-1 mehrere Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C aufweist, wäre es auch möglich, daß eine Rezeptor-Aktivierung eine Phosphorylierung von IIP-1 an Serin/Threonin-Resten induziert.

Zusätzliche Informationen über einen funktionellen Zusammenhang zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor würde man auch durch eine Analyse des Expressionsprofils der stabilen IIP-1-Transfektanten mittels moderner Chip-Technologie erhalten. Gene, die aufgrund einer IIP-1-Überexpression, exprimiert werden, könnten auf eine Korrelation mit IGF-1-abhängigen Funktionen hin überprüft werden.

Selbstverständlich wäre es auch von Interesse, die funktionelle Bedeutung der anderen neuen IGF-1 Rezeptor-interagierenden Proteine wie APS, nck und Grb7 zu untersuchen. Zwar handelt es sich bei diesen Proteinen nicht um so spezifische Bindeproteine wie bei IIP-1 jedoch könnten diese Proteine durchaus eine Rolle in durch IGF-1 aktivierten Signalwegen spielen.

Im Rahmen der '2-Hybrid-Screens' konnten vor allem Interaktionspartner für die C-terminale Domäne des IGF-1 Rezeptors identifiziert werden. Daher wäre es sicherlich interessant, einen '2-Hybrid-Screen' mit einem LexA-Fusionsprotein durchzuführen, das die Isolierung von juxtamembranen Bindungspartnern gewährleistet. Vorversuche haben ergeben, daß sich ein LexA-Konstrukt aus der Kinase-Domäne von tpmet, an die C-terminal die juxtamembrane Region des IGF-1 Rezeptors fusioniert ist, für die Suche nach solchen juxtamembranen Bindungspartnern eignen würde (siehe 1.2.). Es ist sicherlich nicht auszuschließen, daß noch weitere bislang unbekannte Bindungspartner für den IGF-1 Rezeptor existieren, die wie IIP-1 Komponenten der IGF-1-regulierten Signaltransduktionskaskaden sind und damit die spezifischen zellulären Funktionen des IGF-1 Rezeptors vermitteln.

Zusammenfassung

Der IGF-1 Rezeptor gehört zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und zeigt einen hohen Grad an Homologie zu dem Insulin Rezeptor. Auch wenn sich diese beiden Rezeptoren in ihrer Aminosäuresequenz recht ähnlich sind und die meisten bislang identifizierten zytoplasmatischen Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors auch an den Insulin Rezeptor binden, unterscheiden sich die beiden Rezeptoren doch deutlich in ihrer physiologischen Funktion. Während der Insulin Rezeptor vor allem metabolische Prozesse reguliert, spielt der IGF-1 Rezeptor vornehmlich bei Wachstumsprozessen von Zellen eine Rolle. Daher ist anzunehmen, daß weitere spezifische Interaktionspartner für den IGF-1 Rezeptor existieren, die nicht an den Insulin Rezeptor binden und die die spezifischen zellulären Funktionen des IGF-1 Rezeptors vermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des 2-Hybrid-Systems nach solchen spezifischen Bindungspartnern des IGF-1 Rezeptors gesucht. Das 'Screening' einer Maus-Embryo-cDNS-Bibliothek und einer Jurkat-cDNS-Bibliothek mit der zytoplasmatischen Domäne des IGF-1 Rezeptors als Köder resultierte in der Identifizierung einer Reihe von IGF-1 Rezeptor-interagierender Proteine (IIPs). Neben bekannten Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors wie der p85- und der p55-Untereinheit der PI3-Kinase, den Adaptorproteinen Grb10 und SH2B sowie 14-3-3 β wurden interessanterweise auch viele Proteine gefunden, die noch nicht als Bindeproteine des IGF-1 Rezeptors bekannt waren. Dazu zählen verschiedene Proteine mit einer SH2-Domäne wie die Adaptorproteine Grb7, nck β und APS sowie die src-ähnliche Kinase p59fyn. In weitergehenden 2-Hybrid-Analysen stellte sich jedoch heraus, daß diese Signalproteine auch Bindungspartner des Insulin Rezeptors sind. Zwei weitere Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors, IIP-1 und IIP-10, konnten dagegen in dem '2-Hybrid-Screen' identifiziert werden, die nicht an den Insulin Rezeptor binden und damit zu der Vermittlung spezifischer zellulärer Effekte des IGF-1 Rezeptors beitragen könnten.

IIP-1 zeichnet sich durch eine besondere Bindungsspezifität für den IGF-1 Rezeptor in Bezug auf andere Rezeptor-Tyrosinkinasen aus. IIP-1 zeigt weder eine Interaktion mit dem Insulin Rezeptor noch mit anderen getesteten Rezeptor-Tyrosinkinasen wie c-ros, c-met, c-ret, c-fms und c-kit. IIP-1 ist ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 36 kD und weist neben einer N- und einer C-terminalen Region eine zentrale PDZ-Domäne auf. Unter Verwendung von Deletionsmutanten konnte im 2-Hybrid-System gezeigt werden, daß diese zentrale PDZ-Domäne für die Interaktion mit dem C-Terminus des IGF-1 Rezeptors verantwortlich ist, wobei die letzten drei Aminosäuren des Rezeptors (Ser-Thr-Cys) von besonderer Bedeutung für die Interaktion sind. Mittels Ko-Immunpräzipitationsexperimenten konnte die Interaktion zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in transfektierten Säugetierzellen und *in vitro* bestätigt werden. Zudem weisen die Ergebnisse verschiedener im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen IIP-1 und IGF-1 Rezeptor hin. Neben einer Ko-Lokalisation der beiden Proteine in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 wurde ein übereinstimmendes Expressionsmuster von IIP-1 und IGF-1 Rezeptor in einer Reihe von normalen Zellen und Tumorzelllinien gefunden, was auf eine Ko-Regulation der Expression dieser beiden Proteine hindeutet. Desweiteren resultierte die Überexpression von IIP-1 in MCF7 Brustkrebszellen in einer verminderten IGF-1-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase. Außerdem war in diesem Überexpressionssystem ein inhibierender Einfluß von IIP-1 auf die Motilität dieser Zellen, welche u.a. eine IGF-1 Rezeptor-regulierte Zellfunktion ist, zu beobachten. Da die Migration von Zellen eine Parallel zu den in dieser Arbeit

durchgeführten Studien wurde IIP-1 unabhängig als Interaktionspartner für eine Reihe anderer Proteine wie ein G-Protein-regulierendes Protein (GAIP) und ein Semaphorin (Sem-F) beschrieben. Es wäre denkbar, daß IIP-1 über eine zeitgleiche Assoziation mit diesen Bindungspartnern den IGF-1 Rezeptor an G-Protein-regulierte oder Semaphorin-vermittelte Signaltransduktionskaskaden koppelt. Auch IIP-10 stellte sich in 2-Hybrid-Analysen als Interaktionspartner des IGF-1 Rezeptors jedoch nicht des Insulin Rezeptors heraus und könnte so ebenfalls für die Vermittlung der spezifischen IGF-1-induzierten zellulären Effekten verantwortlich sein. Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte IIP-10 im Kern von IGF-1 Rezeptor-überexprimierenden NIH3T3 Zellen lokalisiert werden. Aufgrund dieser nukleären Lokalisation wäre ein ähnlicher Mechanismus wie bei den Zytokin-Rezeptor-bindenden STAT-Proteinen denkbar, die nach einer durch den aktivierten Zytokin-Rezeptor induzierten Phosphorylierung in den Kern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Effektorgene induzieren. Erste funktionelle Studien weisen darauf hin, daß die Überexpression von IIP-10 in IGF-1 Rezeptor-überexprimierenden NIH3T3-Zellen einen inhibitorischen Einfluß auf IGF-1-induzierte Proliferation und IGF-1-vermittelten Apoptoseschutz hat.

Literaturverzeichnis

- Ahmad, S., Singh, N. und Glazer, R. I. (1999).** Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 58, 425-30.
- Allen, J. B., Walberg, M. W., Edwards, M. C. und Elledge, S. J. (1995).** Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem Sci* 20, 511-6.
- Andrews, D. W., Resnicoff, M., Flanders, A. E., Kenyon, L., Curtis, M., Merli, G., Baserga, R., Iliakis, G. und Aiken, R. D. (2001).** Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol* 19, 2189-200.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. und Karin, M. (1997).** Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 17, 3094-102.
- Arteaga, C. L., Kitten, L. J., Coronado, E. B., Jacobs, S., Kull, F. C., Jr., Allred, D. C. und Osborne, C. K. (1989).** Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest* 84, 1418-23.
- Arteaga, C. L. und Osborne, C. K. (1989).** Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedin receptor. *Cancer Res* 49, 6237-41.
- Baron, V., Calleja, V., Ferrari, P., Alengrin, F. und Van Obberghen, E. (1998).** p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem* 273, 7162-8.
- Baselga, J. und Averbuch, S. D. (2000).** ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. *Drugs* 60, 33-40; discussion 41-2.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. und Valentinis, B. (1997).** The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332, F105-26.
- Baserga, R., Resnicoff, M., D'Ambrosio, C. und Valentinis, B. (1997).** The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* 53, 65-98.
- Beech, D. J., Parekh, N. und Pang, Y. (2001).** Insulin-like growth factor-I receptor antagonism results in increased cytotoxicity of breast cancer cells to doxorubicin and taxol. *Oncol Rep* 8, 325-9.
- Blakesley, V. A., Kalebic, T., Helman, L. J., Stannard, B., Faria, T. N., Roberts, C. T., Jr. und LeRoith, D. (1996).** Tumorigenic and mitogenic capacities are reduced in transfected fibroblasts expressing mutant insulin-like growth factor (IGF)-I receptors. The role of tyrosine residues 1250, 1251, and 1316 in the carboxy-terminus of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 137, 410-7.
- Blakesley, V. A., Koval, A. P., Stannard, B. S., Scrimgeour, A. und LeRoith, D. (1998).** Replacement of tyrosine 1251 in the carboxyl terminus of the insulin-like growth factor-I receptor disrupts the actin cytoskeleton and inhibits proliferation and anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 273, 18411-22.
- Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. und LeRoith, D. (1996).** Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 153-9.
- Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001).** Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-65.
- Borg, J. P., Marchetto, S., Le Bivic, A., Ollendorff, V., Jaulin-Bastard, F., Saito, H., Fournier, E., Adelaide, J., Margolis, B. und Birnbaum, D. (2000).** ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2, 407-14.
- Boudreau, N. J. und Jones, P. L. (1999).** Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339, 481-8.

- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brent, R. und Ptashne, M. (1985).** A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729-36.
- Brodt, P., Samani, A. und Navab, R. (2000).** Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochem Pharmacol* 60, 1101-7.
- Brooks, P. C., Klemke, R. L., Schon, S., Lewis, J. M., Schwartz, M. A. und Cheresch, D. A. (1997).** Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin $\alpha v \beta 5$ to promote tumor cell dissemination in vivo. *J Clin Invest* 99, 1390-8.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. und Greenberg, M. E. (1999).** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechi, T., Moelling, K. und Hovens, C. M. (1999).** The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J Cell Biol* 144, 361-71.
- Butler, A. A., Yakar, S., Gewolb, I. H., Karas, M., Okubo, Y. und LeRoith, D. (1998).** Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121, 19-26.
- Cai, H. und Reed, R. R. (1999).** Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* 19, 6519-27.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. und Reed, J. C. (1998).** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-21.
- Casamassima, A. und Rozengurt, E. (1998).** Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex. *J Biol Chem* 273, 26149-56.
- Chambers, G., Lawrie, L., Cash, P. und Murray, G. I. (2000).** Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 192, 280-8.
- Chang, L. und Karin, M. (2001).** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen, Z. und Han, M. (2000).** Building a protein interaction map: research in the post-genome era. *Bioessays* 22, 503-6.
- Choi, S. und Park, S. (1999).** Phosphorylation at Tyr-838 in the kinase domain of EphA8 modulates Fyn binding to the Tyr-615 site by enhancing tyrosine kinase activity. *Oncogene* 18, 5413-22.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. und Slamon, D. J. (1999).** Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-48.
- Cohen, P., Peehl, D. M., Graves, H. C. und Rosenfeld, R. G. (1994).** Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol* 142, 407-15.
- Collett-Solberg, P. F. und Cohen, P. (1996).** The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25, 591-614.

- Colomer, R., Shamon, L. A., Tsai, M. S. und Lupu, R. (2001).** Herceptin: from the bench to the clinic. *Cancer Invest* 19, 49-56.
- Comoglio, P. M., Tamagnone, L. und Boccaccio, C. (1999).** Plasminogen-related growth factor and semaphorin receptors: a gene superfamily controlling invasive growth. *Exp Cell Res* 253, 88-99.
- Cooke, M. P. und Perlmutter, R. M. (1989).** Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol* 1, 66-74.
- Coppola, D., Ferber, A., Miura, M., Sell, C., D'Ambrosio, C., Rubin, R. und Baserga, R. (1994).** A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14, 4588-95.
- Craparo, A., Freund, R. und Gustafson, T. A. (1997).** 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem* 272, 11663-9.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. und Hemmings, B. A. (1995).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-9.
- Dalle, S., Ricketts, W., Imamura, T., Vollenweider, P. und Olefsky, J. M. (2001).** Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *J Biol Chem* 276, 15688-95.
- D'Ambrosio, C., Ferber, A., Resnicoff, M. und Baserga, R. (1996).** A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* 56, 4013-20.
- Datta, S. R., Brunet, A. und Greenberg, M. E. (1999).** Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13, 2905-27.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. E. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-41.
- De Vries, L., Elenko, E., Hubler, L., Jones, T. L. und Farquhar, M. G. (1996).** GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G alpha i subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15203-8.
- De Vries, L., Lou, X., Zhao, G., Zheng, B. und Farquhar, M. G. (1998).** GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12340-5.
- DeAngelis, T., Ferber, A. und Baserga, R. (1995).** Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol* 164, 214-21.
- Dey, B. R., Frick, K., Lopaczynski, W., Nissley, S. P. und Furlanetto, R. W. (1996).** Evidence for the direct interaction of the insulin-like growth factor I receptor with IRS-1, Shc, and Grb10. *Mol Endocrinol* 10, 631-41.
- Dey, B. R., Furlanetto, R. W. und Nissley, P. (2000).** Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 38-43.
- Dickson, R. B. und Lippman, M. E. (1995).** Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 16, 559-89.
- Doerr, M. E. und Jones, J. I. (1996).** The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271, 2443-7.
- Dunn, S. E., Ehrlich, M., Sharp, N. J., Reiss, K., Solomon, G., Hawkins, R., Baserga, R. und Barrett, J. C. (1998).** A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res* 58, 3353-61.
- Dutt, M. J. und Lee, K. H. (2000).** Proteomic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 11, 176-9.

- Eckhardt, S. G., Rizzo, J., Sweeney, K. R., Cropp, G., Baker, S. D., Kraynak, M. A., Kuhn, J. G., Villalona-Calero, M. A., Hammond, L., Weiss, G., Thurman, A., Smith, L., Drengler, R., Eckardt, J. R., Moczygamba, J., Hannah, A. L., Von Hoff, D. D. und Rowinsky, E. K. (1999). Phase I and pharmacologic study of the tyrosine kinase inhibitor SU101 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 17, 1095-104.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103, 767-72.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1999). Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* 11, 432-9.
- Fiddes, R. J., Campbell, D. H., Janes, P. W., Sivertsen, S. P., Sasaki, H., Wallasch, C. und Daly, R. J. (1998). Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3. *J Biol Chem* 273, 7717-24.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Furlanetto, R. W., Dey, B. R., Lopaczynski, W. und Nissley, S. P. (1997). 14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor. *Biochem J* 327, 765-71.
- Furlanetto, R. W., Harwell, S. E. und Baggs, R. B. (1993). Effects of insulin-like growth factor receptor inhibition on human melanomas in culture and in athymic mice. *Cancer Res* 53, 2522-6.
- Galcheva-Gargova, Z., Konstantinov, K. N., Wu, I. H., Klier, F. G., Barrett, T. und Davis, R. J. (1996). Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor. *Science* 272, 1797-802.
- Gansler, T., Furlanetto, R., Gramling, T. S., Robinson, K. A., Blocker, N., Buse, M. G., Sens, D. A. und Garvin, A. J. (1989). Antibody to type I insulinlike growth factor receptor inhibits growth of Wilms' tumor in culture and in athymic mice. *Am J Pathol* 135, 961-6.
- Gao, Y., Li, M., Chen, W. und Simons, M. (2000). Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol* 184, 373-9.
- Garcia, R. A., Vasudevan, K. und Buonanno, A. (2000). The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3596-601.
- Germani, A., Romero, F., Houlard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S. und Varin-Blank, N. (1999). hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol* 19, 3798-807.
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-32.
- Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. und Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo J* 10, 1135-47.
- Grant, M., Jerdan, J. und Merimee, T. J. (1987). Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 370-1.
- Grothey, A., Voigt, W., Schober, C., Muller, T., Dempke, W. und Schmoll, H. J. (1999). The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 166-73.
- Gual, P., Baron, V., Lequoy, V. und Van Obberghen, E. (1998). Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* 139, 884-93.
- Guo, C. H., Janovick, J. A., Kuphal, D. und Conn, P. M. (1995). Transient transfection of GGH3-1' cells [GH3 cells stably transfected with the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor complementary deoxyribonucleic acid] with the carboxyl-terminal of beta-adrenergic receptor kinase 1 blocks prolactin release: evidence for a role of the G protein beta gamma-subunit complex in GnRH signal transduction. *Endocrinology* 136, 3031-6.

- Guvakova, M. A. und Surmacz, E. (1999).** The activated insulin-like growth factor I receptor induces depolarization in breast epithelial cells characterized by actin filament disassembly and tyrosine dephosphorylation of FAK, Cas, and paxillin. *Exp Cell Res* 251, 244-55.
- Harrington, E. A., Bennett, M. R., Fanidi, A. und Evan, G. I. (1994).** c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J* 13, 3286-95.
- He, W., Craparo, A., Zhu, Y., O'Neill, T. J., Wang, L. M., Pierce, J. H. und Gustafson, T. A. (1996).** Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J Biol Chem* 271, 11641-5.
- He, W., O'Neill, T. J. und Gustafson, T. A. (1995).** Distinct modes of interaction of SHC and insulin receptor substrate-1 with the insulin receptor NPEY region via non-SH2 domains. *J Biol Chem* 270, 23258-62.
- He, W., Rose, D. W., Olefsky, J. M. und Gustafson, T. A. (1998).** Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second novel domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. *J Biol Chem* 273, 6860-7.
- Hernandez-Sanchez, C., Werner, H., Roberts, C. T., Jr., Woo, E. J., Hum, D. W., Rosenthal, S. M. und LeRoith, D. (1997).** Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J Biol Chem* 272, 4663-70.
- Hock, B., Bohme, B., Karn, T., Feller, S., Rubsamen-Waigmann, H. und Strebhardt, K. (1998).** Tyrosine-614, the major autophosphorylation site of the receptor tyrosine kinase HEK2, functions as multi-docking site for SH2-domain mediated interactions. *Oncogene* 17, 255-60.
- Hock, B., Bohme, B., Karn, T., Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Holtrich, U., Holland, S., Pawson, T., Rubsamen-Waigmann, H. und Strebhardt, K. (1998).** PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9779-84.
- Hongo, A., D'Ambrosio, C., Miura, M., Morrione, A. und Baserga, R. (1996).** Mutational analysis of the mitogenic and transforming activities of the insulin-like growth factor I receptor. *Oncogene* 12, 1231-8.
- Hsu, D., Knudson, P. E., Zapf, A., Rolband, G. C. und Olefsky, J. M. (1994).** NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134, 744-50.
- Igarashi, K., Isohara, T., Kato, T., Shigeta, K., Yamano, T. und Uno, I. (1998).** Tyrosine 1213 of Flt-1 is a major binding site of Nck and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 95-9.
- Ihle, J. N. (2001).** The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13, 211-7.
- Imai, Y. und Clemmons, D. R. (1999).** Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and deoxyribonucleic acid synthesis by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 140, 4228-35.
- Iwasaki, Y., Gay, B., Wada, K. und Koizumi, S. (1998).** Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. *J Neurochem* 71, 106-11.
- Janes, P. W., Lackmann, M., Church, W. B., Sanderson, G. M., Sutherland, R. L. und Daly, R. J. (1997).** Structural determinants of the interaction between the erbB2 receptor and the Src homology 2 domain of Grb7. *J Biol Chem* 272, 8490-7.
- Jones, J. I. und Clemmons, D. R. (1995).** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.
- Jones, J. I., Prevette, T., Gockerman, A. und Clemmons, D. R. (1996).** Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2482-7.

- Jones, N., Master, Z., Jones, J., Bouchard, D., Gunji, Y., Sasaki, H., Daly, R., Alitalo, K. und Dumont, D. J. (1999).** Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem* 274, 30896-905.
- Joshi, A. K., Witkowski, A. und Smith, S. (1998).** The malonyl/acetyltransferase and beta-ketoacyl synthase domains of the animal fatty acid synthase can cooperate with the acyl carrier protein domain of either subunit. *Biochemistry* 37, 2515-23.
- Kadowaki, T., Tobe, K., Honda-Yamamoto, R., Tamemoto, H., Kaburagi, Y., Momomura, K., Ueki, K., Takahashi, Y., Yamauchi, T., Akanuma, Y. und Yazaki, Y. (1996).** Signal transduction mechanism of insulin and insulin-like growth factor-1. *Endocr J* 43 Suppl, S33-41.
- Kaech, S. M., Whitfield, C. W. und Kim, S. K. (1998).** The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94, 761-71.
- Kaleko, M., Rutter, W. J. und Miller, A. D. (1990).** Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 10, 464-73.
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T., Jr. und LeRoith, D. (1994).** Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 8, 40-50.
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T., Jr. und LeRoith, D. (1993).** Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268, 2655-61.
- Keegan, K. und Cooper, J. A. (1996).** Use of the two hybrid system to detect the association of the protein-tyrosine-phosphatase, SHPTP2, with another SH2-containing protein, Grb7. *Oncogene* 12, 1537-44.
- Kellerer, M., Mushack, J., Seffer, E., Mischak, H., Ullrich, A. und Haring, H. U. (1998).** Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41, 833-8.
- Kelley, K. M., Oh, Y., Gargosky, S. E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D. M. und Rosenfeld, R. G. (1996).** Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 619-37.
- Kiess, W., Lee, L., Graham, D. E., Greenstein, L., Tseng, L. Y., Rechler, M. M. und Nissley, S. P. (1989).** Rat C6 glial cells synthesize insulin-like growth factor I (IGF-I) and express IGF-I receptors and IGF-II/mannose 6-phosphate receptors. *Endocrinology* 124, 1727-36.
- Kim, B., Leventhal, P. S., Saltiel, A. R., and Feldman, E. L. (1997).** Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 272, 21268-73.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y. und Ruvkun, G. (1997).** daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* [see comments]. *Science* 277, 942-6.
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P. und Cheresch, D. A. (1997).** Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137, 481-92.
- Klemke, R. L., Yebra, M., Bayna, E. M. und Cheresch, D. A. (1994).** Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J Cell Biol* 127, 859-66.
- Lammers, R., Gray, A., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1989).** Differential signalling potential of insulin- and IGF-1-receptor cytoplasmic domains. *Embo J* 8, 1369-75.
- Lamothe, B., Bucchini, D., Jami, J. und Joshi, R. L. (1995).** Interaction of p85 subunit of PI 3-kinase with insulin and IGF-1 receptors analysed by using the two-hybrid system. *FEBS Lett* 373, 51-5.

- Lee, A. V. und Yee, D. (1995).** Insulin-like growth factors and breast cancer. *Biomed Pharmacother* 49, 415-21.
- Lee, C. T., Wu, S., Gabrilovich, D., Chen, H., Nadaf-Rahrov, S., Ciernik, I. F. und Carbone, D. P. (1996).** Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 56, 3038-41.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. und Schlessinger, J. (1996).** PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85, 621-4.
- Leventhal, P. S., Shelden, E. A., Kim, B. und Feldman, E. L. (1997).** Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem* 272, 5214-8.
- Li, S. und Baserga, R. (1996).** Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor regulate the activity of the insulin-like growth factor I gene promoter. *Exp Gerontol* 31, 195-206.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1993).** Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Long, L., Rubin, R., Baserga, R. und Brodt, P. (1995).** Loss of the metastatic phenotype in murine carcinoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 55, 1006-9.
- Lou, X., Yano, H., Lee, F., Chao, M. V. und Farquhar, M. G. (2001).** GIPC and GAIP Form a Complex with TrkA: A Putative Link between G Protein and Receptor Tyrosine Kinase Pathways. *Mol Biol Cell* 12, 615-27.
- Lyons, S. und Nelson, N. (1984).** An immunological method for detecting gene expression in yeast colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7426-30.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1988).** Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-6.
- Macaulay, V. M. (1992).** Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65, 311-20.
- Mackay, J. P. und Crossley, M. (1998).** Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci* 23, 1-4.
- Mancini, A., Koch, A., Stefan, M., Niemann, H. und Tamura, T. (2000).** The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity. *FEBS Lett* 482, 54-8.
- Marks, D. C., Csar, X. F., Wilson, N. J., Novak, U., Ward, A. C., Kanagasundaram, V., Hoffmann, B. W. und Hamilton, J. A. (1999).** Expression of a Y559F mutant CSF-1 receptor in M1 myeloid cells: a role for Src kinases in CSF-1 receptor-mediated differentiation. *Mol Cell Biol Res Commun* 1, 144-52.
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Behringer, R. R., D'Ercole, A. J., Bell, G. I., Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. (1988).** Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 123, 2827-33.
- Maudsley, S., Zamah, A. M., Rahman, N., Blitzer, J. T., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. und Hall, R. A. (2000).** Platelet-derived growth factor receptor association with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol Cell Biol* 20, 8352-63.
- Mauro, L., Sisci, D., Bartucci, M., Salerno, M., Kim, J., Tam, T., Guvakova, M. A., Ando, S. und Surmacz, E. (1999).** SHC-alpha5beta1 integrin interactions regulate breast cancer cell adhesion and motility. *Exp Cell Res* 252, 439-48.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Mayo, M. W., Algate, P. A., Dellow, R. A. und Kaleko, M. (1991).** Growth-promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. *Blood* 78, 921-9.

- McDonald, W. H. und Yates, J. R., 3rd (2000).** Proteomic tools for cell biology. *Traffic* 1, 747-54.
- Mendel, D. B., Laird, A. D., Smolich, B. D., Blake, R. A., Liang, C., Hannah, A. L., Shaheen, R. M., Ellis, L. M., Weitman, S., Shawver, L. K. und Cherrington, J. M. (2000).** Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Des* 15, 29-41.
- Miura, K. und MacGlashan, D. W. (2000).** Phosphatidylinositol-3 kinase regulates p21ras activation during IgE-mediated stimulation of human basophils. *Blood* 96, 2199-205.
- Miura, M., Li, S. und Baserga, R. (1995).** Effect of a mutation at tyrosine 950 of the insulin-like growth factor I receptor on the growth and transformation of cells. *Cancer Res* 55, 663-7.
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A. und Rutter, W. J. (1987).** Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329, 301-7.
- Morrione, A., DeAngelis, T. und Baserga, R. (1995).** Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor I receptor genes. *J Virol* 69, 5300-3.
- Morrione, A., Valentinis, B., Li, S., Ooi, J. Y., Margolis, B. und Baserga, R. (1996).** Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* 56, 3165-7.
- Mothe, I., Delahaye, L., Filloux, C., Pons, S., White, M. F. und Van Obberghen, E. (1997).** Interaction of wild type and dominant-negative p55PIK regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase with insulin-like growth factor-1 signaling proteins. *Mol Endocrinol* 11, 1911-23.
- Noce, T., Fujiwara, Y., Sezaki, M., Fujimoto, H. und Higashinakagawa, T. (1992).** Expression of a mouse zinc finger protein gene in both spermatocytes and oocytes during meiosis. *Dev Biol* 153, 356-67.
- Oates, A. J., Schumaker, L. M., Jenkins, S. B., Pearce, A. A., DaCosta, S. A., Arun, B. und Ellis, M. J. (1998).** The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 47, 269-81.
- Ohashi, K., Mizuno, K., Kuma, K., Miyata, T. und Nakamura, T. (1994).** Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain. *Oncogene* 9, 699-705.
- Osborne, M. A., Dalton, S. und Kochan, J. P. (1995).** The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions [see comments]. *Biotechnology (N Y)* 13, 1474-8.
- Pandey, A., Duan, H., Di Fiore, P. P. und Dixit, V. M. (1995).** The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* 270, 21461-3.
- Pandey, A., Liu, X., Dixon, J. E., Di Fiore, P. P. und Dixit, V. M. (1996).** Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7. *J Biol Chem* 271, 10607-10.
- Pawson, T. und Scott, J. D. (1997).** Signaling through scaffold, anchoring und adaptor proteins. *Science* 278, 2075-80.
- Perer, E. S., Madan, A. K., Shurin, A., Zakris, E., Romeguera, K., Pang, Y. und Beech, D. J. (2000).** Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells. *J Surg Res* 94, 1-5.
- Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A. und Slamon, D. J. (1998).** Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 17, 2235-49.
- Pietrzkowski, Z., Lammers, R., Carpenter, G., Soderquist, A. M., Limardo, M., Phillips, P. D., Ullrich, A. und Baserga, R. (1992).** Constitutive expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor abrogates all requirements for exogenous growth factors. *Cell Growth Differ* 3, 199-205.

- Pietrzkowski, Z., Sell, C., Lammers, R., Ullrich, A. und Baserga, R. (1992).** Roles of insulinlike growth factor 1 (IGF-1) and the IGF-1 receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 12, 3883-9.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. und Blake, D. J. (1997).** PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19, 469-79.
- Porcu, P., Ferber, A., Pietrzkowski, Z., Roberts, C. T., Adamo, M., LeRoith, D. und Baserga, R. (1992).** The growth-stimulatory effect of simian virus 40 T antigen requires the interaction of insulinlike growth factor 1 with its receptor. *Mol Cell Biol* 12, 5069-77.
- Qu, B. H., Karas, M., Koval, A. und LeRoith, D. (1999).** Insulin receptor substrate-4 enhances insulin-like growth factor-I-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 274, 31179-84.
- Quinn, K. A., Treston, A. M., Unsworth, E. J., Miller, M. J., Vos, M., Grimley, C., Battley, J., Mulshine, J. L. und Cuttitta, F. (1996).** Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. *J Biol Chem* 271, 11477-83.
- Rapraeger, A. C. (2000).** Syndecan-regulated receptor signaling [comment]. *J Cell Biol* 149, 995-8.
- Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P. und Baserga, R. (1995).** The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 55, 2463-9.
- Resnicoff, M., Ambrose, D., Coppola, D. und Rubin, R. (1993).** Insulin-like growth factor-1 and its receptor mediate the autocrine proliferation of human ovarian carcinoma cell lines. *Lab Invest* 69, 756-60.
- Resnicoff, M., Burgaud, J. L., Rotman, H. L., Abraham, D. und Baserga, R. (1995).** Correlation between apoptosis, tumorigenesis und levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 55, 3739-41.
- Resnicoff, M., Sell, C., Rubini, M., Coppola, D., Ambrose, D., Baserga, R. und Rubin, R. (1994).** Rat glioblastoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor are nontumorigenic and induce regression of wild-type tumors. *Cancer Res* 54, 2218-22.
- Riedel, H., Wang, J., Hansen, H. und Yousaf, N. (1997).** PSM, an insulin-dependent, pro-rich, PH, SH2 domain containing partner of the insulin receptor. *J Biochem (Tokyo)* 122, 1105-13.
- Riedel, H., Yousaf, N., Zhao, Y., Dai, H., Deng, Y. und Wang, J. (2000).** PSM, a mediator of PDGF-BB-, IGF-I- und insulin-stimulated mitogenesis. *Oncogene* 19, 39-50.
- Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F. und Jalinot, P. (1998).** The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* 16, 643-54.
- Rubin, R. und Baserga, R. (1995).** Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis und tumorigenicity. *Lab Invest* 73, 311-31.
- Rubini, M., Hongo, A., D'Ambrosio, C. und Baserga, R. (1997).** The IGF-I receptor in mitogenesis and transformation of mouse embryo cells: role of receptor number. *Exp Cell Res* 230, 284-92.
- Rubini, M., Werner, H., Gandini, E., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D. und Baserga, R. (1994).** Platelet-derived growth factor increases the activity of the promoter of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene. *Exp Cell Res* 211, 374-9.
- Russell, W. E., Van Wyk, J. J. und Pledger, W. J. (1984).** Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2389-92.
- Salmon, W. D. und Maughday, W. H. (1957).** A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation. *J Lab Clin Med* 49, 825-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press *Cold Spring Harbor, NY*.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Sedlacek, H. H. (2000).** Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. *Drugs* 59, 435-76.
- Seely, B. L., Reichart, D. R., Staubs, P. A., Jhun, B. H., Hsu, D., Maegawa, H., Milarski, K. L., Saltiel, A. R. und Olefsky, J. M. (1995).** Localization of the insulin-like growth factor I receptor binding sites for the SH2 domain proteins p85, Syp, and GTPase activating protein. *J Biol Chem* 270, 19151-7.
- Sell, C., Baserga, R. und Rubin, R. (1995).** Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 55, 303-6.
- Sell, C., Dumenil, G., Deveda, C., Miura, M., Coppola, D., DeAngelis, T., Rubin, R., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1994).** Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 14, 3604-12.
- Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J. P., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1993).** Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11217-21.
- She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B. und Li, W. (1997).** Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol Biol Cell* 8, 1709-21.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C. (1997).** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-7.
- Stein, E., Cerretti, D. P. und Daniel, T. O. (1996).** Ligand activation of ELK receptor tyrosine kinase promotes its association with Grb10 and Grb2 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 23588-93.
- Stein, E., Huynh-Do, U., Lane, A. A., Cerretti, D. P. und Daniel, T. O. (1998).** Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273, 1303-8.
- Stracke, M. L., Engel, J. D., Wilson, L. W., Rechler, M. M., Liotta, L. A. und Schiffmann, E. (1989).** The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264, 21544-9.
- Tamagnone, L. und Comoglio, P. M. (2000).** Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 10, 377-83.
- Tamura, T., Mancini, A., Joos, H., Koch, A., Hakim, C., Dumanski, J., Weidner, K. M. und Niemann, H. (1999).** FMIP, a novel Fms-interacting protein, affects granulocyte/macrophage differentiation. *Oncogene* 18, 6488-95.
- Tartare-Deckert, S., Sawka-Verhelle, D., Murdaca, J. und Van Obberghen, E. (1995).** Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in the yeast two-hybrid system. *J Biol Chem* 270, 23456-60.
- Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M. und Ronnstrand, L. (1999).** Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J* 341, 211-6.
- Thomson, J. M., Waldrip, H. W. und Compton, M. M. (1997).** Identification of a differential display product associated with apoptosis in chicken thymocytes. *Dev Comp Immunol* 21, 413-24.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J. M. (2000).** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Nature* 403, 623-7.

- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E. und et al. (1986).** Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* 5, 2503-12.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. und Boeke, J. D. (1996).** Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10315-20.
- Volk, R., Schwartz, J. J., Li, J., Rosenberg, R. D. und Simons, M. (1999).** The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 274, 24417-24.
- Walhout, A. J., Boulton, S. J. und Vidal, M. (2000).** Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast* 17, 88-94.
- Wang, J., Dai, H., Yousaf, N., Moussaif, M., Deng, Y., Boufelliga, A., Swamy, O. R., Leone, M. E. und Riedel, H. (1999).** Grb10, a positive, stimulatory signaling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor I-, and insulin-mediated mitogenesis. *Mol Cell Biol* 19, 6217-28.
- Wang, J. und Riedel, H. (1998).** Insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor association with a Src homology-2 domain-containing putative adapter. *J Biol Chem* 273, 3136-9.
- Wang, L. H., Kalb, R. G. und Strittmatter, S. M. (1999).** A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF. *J Biol Chem* 274, 14137-46.
- Waters, S. B. und Pessin, J. E. (1996).** Insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1 and IRS2): what a tangled web we weave. *Trends in Cell Biology* 6, 1-4.
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J. und Birchmeier, W. (1996).** Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173-6.
- Weidner, K. M., Ligensa, T., Schumacher, R. und Stern, A. (Erfinder); Hoffmann-La Roche AG (Anmelder) (2000).** IGF-1 receptor interacting proteins (IIPs), genes coding therefor and uses thereof. European Patent Application *EP 1006184*.
- Werner, H., Adamo, M., Roberts, C. T., Jr. und LeRoith, D. (1994).** Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. *Vitam Horm* 48, 1-58.
- Werner, H., Karnieli, E., Rauscher, F. J. und LeRoith, D. (1996).** Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8318-23.
- Werner, H., Rauscher, F. J., 3rd, Sukhatme, V. P., Drummond, I. A., Roberts, C. T., Jr. und LeRoith, D. (1994).** Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J Biol Chem* 269, 12577-82.
- Xu, P., Jacobs, A. R. und Taylor, S. I. (1999).** Interaction of insulin receptor substrate 3 with insulin receptor, insulin receptor-related receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, and downstream signaling proteins. *J Biol Chem* 274, 15262-70.
- Yakar, S., Liu, J. L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B. und LeRoith, D. (1999).** Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7324-9.
- Yang, M., Wu, Z. und Fields, S. (1995).** Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* 23, 1152-6.
- Yokote, K., Margolis, B., Heldin, C. H. und Claesson-Welsh, L. (1996).** Grb7 is a downstream signaling component of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors. *J Biol Chem* 271, 30942-9.
- Yokouchi, M., Suzuki, R., Masuhara, M., Komiya, S., Inoue, A. und Yoshimura, A. (1997).** Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation. *Oncogene* 15, 7-15.

Yokouchi, M., Wakioka, T., Sakamoto, H., Yasukawa, H., Ohtsuka, S., Sasaki, A., Ohtsubo, M., Valius, M., Inoue, A., Komiya, S. und Yoshimura, A. (1999). APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene 18*, 759-67.

Yoshinouchi, M. und Baserga, R. (1993). The role of the IGF-1 receptor in the stimulation of cells by short pulses of growth factors. *Cell Prolif 26*, 139-46.

Yu, H. und Rohan, T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst 92*, 1472-89.

Yu, H. H. und Kolodkin, A. L. (1999). Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron 22*, 11-4.

Zhang, J. und Lautar, S. (1996). A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem 242*, 68-72.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Tanja Stefanie Ligensa
geboren am 08. November 1971
in Leverkusen

Schulbildung

1978-1982	Grundschule Lohmar
1982-1991	Städtisches Anno- Gymnasium Siegburg
06/1991	Abitur

Studium

1991-1996	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg (Fachrichtung: Molekularbiologie, Immunologie, Virologie)
1995	Diplom-Prüfungen
1995-1996	Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. K.-H. Seifart Thema: Untersuchungen zur Transkriptionskompetenz chromatin-assoziiierter klassischer RNA-Polymerase III-Gene
seit 07/1997	Dissertation am Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie, unter Anleitung von PD Dr. G. Jaques und am Pharmaforschungszentrum der Roche Diagnostics GmbH Penzberg unter Anleitung von Dr. K. M. Weidner Thema: Identifizierung und Charakterisierung von neuen zytoplasmatischen Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Beato, Bestgen, Buckel, Drenckhahn, Dressler, Fischer, Frenking, Fruhstorfer, Ganßauge, Garten, Gemsa, Habermehl, Hartmann, Havemann, Herrler, Jaques, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Klenk, Kindl, Kirchner, Koolmann, Kummer, Lang, Lefkovitz, Lührmann, Mannheim, Mannherz, Melsheimer, Müller, Niessing, Petzoldt, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schäfer, Schuhmacher, Schulz, Seifart, Seitz, Slenczka, Thauer, Voigt, von Löw, Waßmuth, Wesemann, Wiegand.

Danksagung

Frau PD Dr. G. Jaques danke ich sehr für die Betreuung dieser Arbeit. Ihr Interesse an dem Thema und die Übernahme des Referates haben die Verwirklichung der Arbeit erst ermöglicht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. K. M. Weidner für die Anregung dieser Arbeit, sein immer offenes Ohr und seinen wissenschaftlichen Beistand. Danke für die konstruktive Kritik in allen Phasen der Arbeit und die vielen Ideen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Ein großes Dankeschön an Dr. R. Schumacher für seine ständige Diskussionsbereitschaft und an Dr. S. Klostermann für die Unterstützung bei der Bioinformatik. Dr. M. Kubbies danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Zelllinien und H. Barchet für viele nützliche Tipps bei der Durchführung der Migrationsassays.

Bei der ehemaligen und jetzigen Besetzung der TR-BG6-Gruppe Alexandra Daser, Karin Gaus, Christiane Hartl, Joachim Frische, Sigfried Hapfelmeier, Diana Weininger, Bettina Bauermann und Sonia Krauss möchte ich mich ganz herzlich für das äußerst nette Arbeitsklima, die pragmatischen Hilfestellungen in allen ‘Laborlagen’ und die vielen aufmunternden Gespräche bedanken.

Allen Mitgliedern der Abteilung Dr. A. Stern danke ich für ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft.

Meinen Mitdoktoranden Dr. Andrea Gnirke, Tanja Schneider, Dr. Thorsten Gutjahr, Dr. Barbara Zehentner, Dr. Tobias Hildebrandt, Dr. Anja Haussmann, Dirk Demuth, Christian Klein, Dr. Kathrin Sichler, Bettina Gansneder, Stephanie Lösch, Nesrine Tarbé, Vesna Evtimova, Robert de Lange und Nicole Euer danke ich für die freundschaftliche Unterstützung, die oft über das Laborleben hinausging, und die gegenseitige Motivation. Es war eine schöne Zeit mit Euch! Sehr am Herzen liegt es mir, Josef Preiherr zu danken, der seine Dissertation nicht beenden konnte. Du hast uns vorgelebt, daß man das Promovieren auch mit Gelassenheit angehen kann!

Den Freunden, die ich in Penzberg gefunden habe, danke ich von ganzem Herzen für den menschlichen Beistand, den Ihr mir so oft gegeben habt. Ihr habt es geschafft, daß aus einer Flachlandtirolerin eine überzeugte Voralplerin geworden ist. Danke für die vielen unvergeßlichen Bergtouren, Skiausflüge und Sommerabende an den oberbayrischen Seen!

Vor allem aber bin ich meiner Familie für ihre Unterstützung in Form von vielen Telefonaten, ‘Care-Paketen’ und einfach dadurch, daß Ihr immer für mich da seid, zutiefst dankbar. Ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen!

DANKE.....

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Identifizierung und Charakterisierung von
neuen zytoplasmatischen Interaktionspartnern des IGF-1 Rezeptors

am Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie, unter Leitung von Prof. Dr. A. Neubauer mit Unterstützung von PD Dr. G. Jaques und am Pharmaforschungszentrum der Roche Diagnostics GmbH unter Anleitung von Dr. K. M. Weidner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung dieser Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ligensa, T., Krauss, S., Demuth, D., Schumacher R., Camonis, J., Jaques, G. und Weidner, K. M. (2001). A PDZ domain protein interacts with the C-terminal tail of the insulin-like growth factor-1 receptor but not with the insulin receptor. In Druck bei J. Biol. Chem..

Weidner, K. M., **Ligensa, T.**, Schumacher, R. und Stern, A.(Erfinder), Hoffmann-La Roche AG (Anmelder) (2000). IGF-1 receptor interacting proteins (IIPs), genes coding therefor and uses thereof. European Patent Application *EP 1006184*.

Vayssi re, B., Zalcman, G., Mah , Y., Mirey, G., **Ligensa, T.**, Weidner, K.M., Chardin, P., Camonis, P. (1999). Interaction of the Grb7 adapter protein with Rnd1, a new member of the Rho family. FEBS letters 467, 91-96.

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden bzw. werden auf folgenden Kongressen präsentiert:

FASEB Summer Research Conference, Growth factor receptor tyrosine kinases in mitogenesis, morphogenesis and tumorigenesis', Snowmass Village, USA, 31/07/99 – 05/08/99.

,IGFs and Cancer', Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 15/09/00-17/09/00.

FASEB Summer Research Conference, Growth factor receptor tyrosine kinases in mitogenesis, morphogenesis and tumorigenesis', Snowmass Village, USA, 04/08/01 – 09/08/01.